

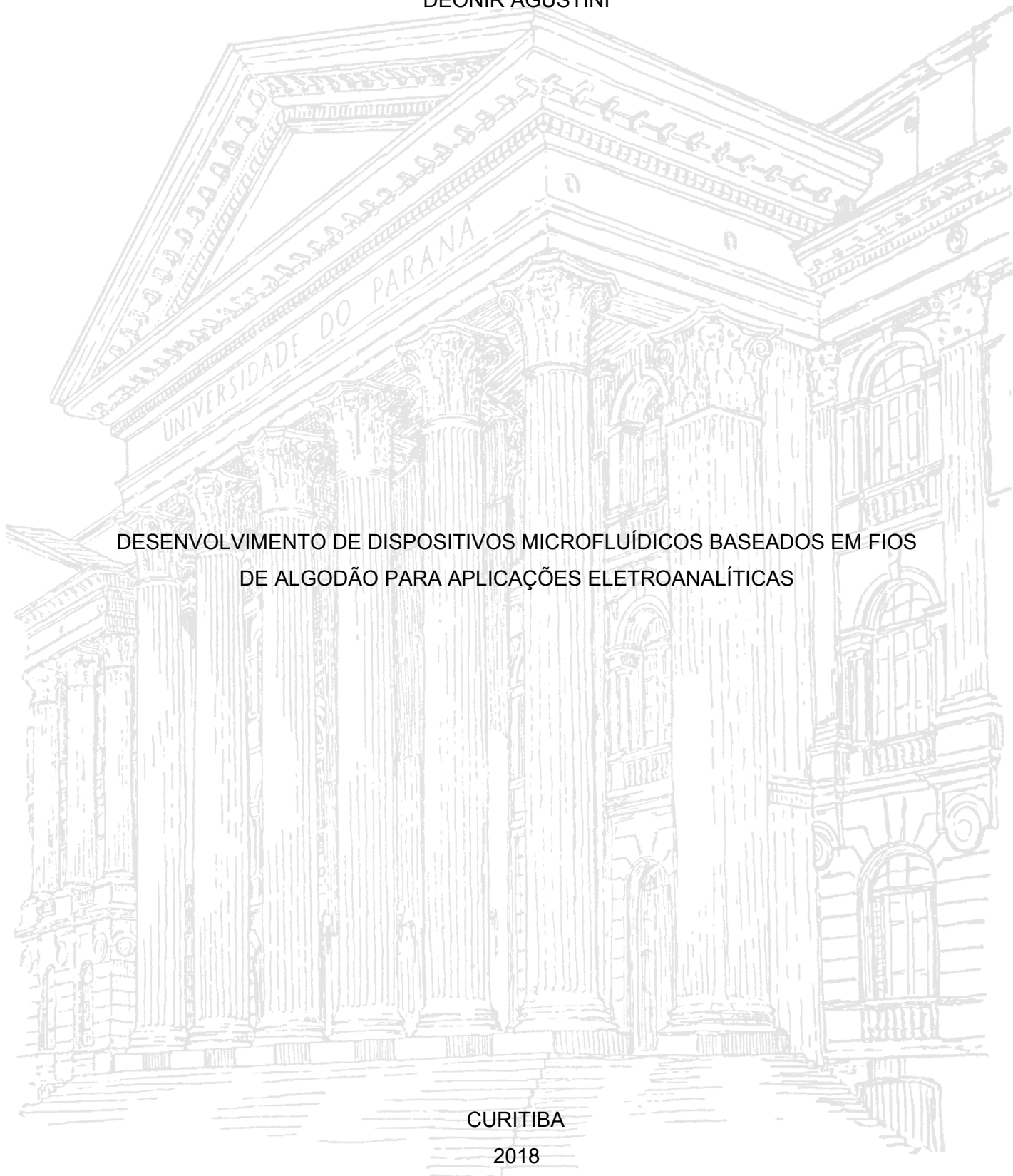
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

DEONIR AGUSTINI

DESENVOLVIMENTO DE DISPOSITIVOS MICROFLUÍDICOS BASEADOS EM FIOS
DE ALGODÃO PARA APLICAÇÕES ELETROANALÍTICAS

CURITIBA

2018



DEONIR AGUSTINI

DESENVOLVIMENTO DE DISPOSITIVOS MICROFLUÍDICOS BASEADOS EM FIOS
DE ALGODÃO PARA APLICAÇÕES ELETROANALÍTICAS

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Química, Área de Concentração em Química Analítica, Departamento de Química, Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Química.

Orientador:
Prof. Dr. Luiz Humberto Marcolino-Junior

Coorientador:
Prof. Dr. Márcio Fernando Bergamini

CURITIBA
2018

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELO SISTEMA DE BIBLIOTECAS/UFPR
BIBLIOTECA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA

AG284d Agustini, Deonir
Desenvolvimento de dispositivos microfluídicos baseados em fios de algodão para aplicações eletroanalíticas / Deonir Agustini. – Curitiba, 2018.
217 p. : il. color. ; 30 cm.

Tese - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, 2018.

Orientador: Luiz Humberto Marcolino-Junior.
Coorientador: Márcio Fernando Bergamini.

1. Dispositivos microfluídicos. 2. Fios de algodão. 3. Técnicas eletroquímicas. 4. Análises em microfluxo. I. Universidade Federal do Paraná. II. Marcolino-Junior, Luiz Humberto. III. Bergamini, Márcio Fernando. IV. Título.

CDD: 543

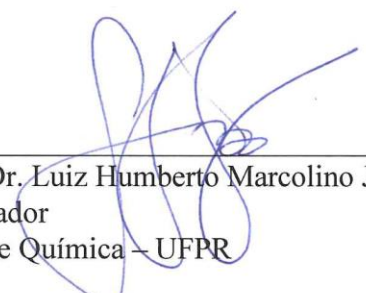
TERMO DE APROVAÇÃO

**DESENVOLVIMENTO DE DISPOSITIVOS MICROFLUÍDICOS
BASEADOS EM FIOS DE ALGODÃO PARA APLICAÇÕES
ELETROANALÍTICAS**

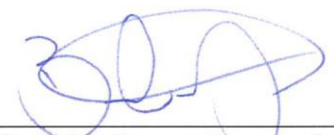
por

DEONIR AGUSTINI


Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Química, pela Comissão Examinadora composta por:



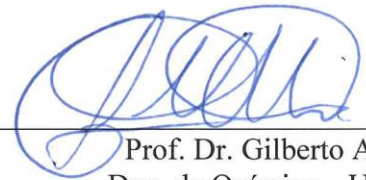
Prof. Dr. Luiz Humberto Marcolino Jr.
Orientador
Dep. de Química – UFPR




Prof. Dr. Bruno Campos Janegitz
Dep. de Ciências da Natureza, Matemática e Educação – UFSCar



Prof. Dr. Ronaldo Censi Faria
Dep. de Química – UFSCar



Prof. Dr. Gilberto Abate
Dep. de Química – UFPR



Prof. Dr. Marcio Eduardo Vidotti Miyata
Dep. de Química – UFPR

Curitiba, 20 de abril de 2018.

Dedico este trabalho à Deus
e a minha esposa Camila.

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores Professor Luiz Humberto Marcolino Júnior e Professor Márcio Fernando Bergamini, por terem me aceitado em seu grupo de pesquisa, pelas contribuições fundamentais ao longo do trabalho, por nunca estarem ocupados para auxiliar e discutir conteúdos e pela grande amizade criada.

Aos professores Marcio Vidotti, Gilberto Abate e Noemi Nagata pelas excelentes contribuições no exame de qualificação do doutorado.

A todos os colegas do LabSensE pelo ótimo ambiente, amizades, parceria, auxílio e compreensão das minhas ausências devido ao meu trabalho no Centro de Microscopia Eletrônica.

Ao Maurício A. Poletti Papi pelos auxílios e análise de FTIR.

Aos colegas e amigos que coletaram lágrimas e sangue para as análises de glicose, ácido ascórbico e dopamina.

Ao Lucas Fedalto pela extrema disponibilidade e dedicação nas análises, especialmente nos estudos que demoravam várias horas.

Ao Luis Gustavo de Matos dos Santos pela modelagem e impressão das peças 3D utilizadas no trabalho.

Ao Douglas Agustini pelo desenvolvimento e configuração do sistema eletrônico miniaturizado de medida e do aplicativo para recepção das análises em *smartphone*.

A todos do Centro de Microscopia Eletrônica pelo auxílio e compreensão ao longo do mestrado e doutorado.

Aos professores e funcionários do Departamento de Química da UFPR.

Aos meus pais, pela excelente estrutura familiar, educação, princípios e ética ensinados.

A minha esposa Camila pela enorme compreensão pela minha falta de tempo devido aos estudos durante as noites e aos fins de semana.

RESUMO

Este trabalho consiste na construção e desenvolvimento de cinco dispositivos microfluídicos contendo canais feitos por fios de algodão hidrofílicos e detecção eletroquímica dos analitos (μ TED). Os dispositivos foram fabricados por processos simples, empregando materiais de baixo custo e de fácil aquisição, visando a aplicação em análises de microfluxo com o transporte das soluções nos canais microfluídicos sendo feito apenas pela ação capilar e gravitacional. O μ TED-1 foi empregado na determinação simultânea de acetaminofeno e diclofenaco por amperometria de múltiplos pulsos com eletrodos compostos por cilindros de grafite. O μ TED-2 foi utilizado na detecção cronoamperométrica de naproxeno, sendo obtida uma frequência analítica de 208 injeções por hora e uma geração de resíduo de apenas 40,0 μ L por análise. No μ TED-3, um biossensor enzimático seletivo para glicose e composto por um filme de poli (O-Toluidina) e glicose oxidase foi integrado ao dispositivo, o qual foi empregado na determinação dos níveis de glicose contidos em amostras de lágrimas. O μ TED-4 foi utilizado na determinação de misturas contendo ácido ascórbico e dopamina, através de separações cromatográficas realizadas nos próprios fios de algodão (contendo grupos carboxílicos) que compõe o canal microfluídico do dispositivo e detecção por cronoamperometria empregando eletrodos de Au também construídos diretamente nos fios do canal microfluídico. Além disso, o dispositivo foi aplicado na separação e determinação seletiva de ácido ascórbico e dopamina em amostras de lágrimas. Por fim, o μ TED-5 foi construído em uma plataforma versátil e totalmente portátil, contendo um sistema de medida cronoamperométrico miniaturizado, o qual possuía alimentação elétrica feita por baterias e transmissão dos dados via USB ou *bluetooth*. Três tipos diferentes de eletrodos foram empregados neste dispositivo: eletrodos de grafite, eletrodo de carbono impresso e eletrodos de Au. Os dispositivos microfluídicos construídos neste trabalho permitiram a realização de análises eletroquímicas em microfluxo com um baixo custo, pequena geração de resíduos e com um bom desempenho analítico.

Palavras chave: dispositivos microfluídicos, fios de algodão, técnicas eletroquímicas, análises em microfluxo.

ABSTRACT

This work consists of the construction and development of five microfluidic devices containing channels made by hydrophilic cotton threads and electrochemical detection of analytes (μ TED). The devices were manufactured by simple processes, using low cost and easy acquisition materials, aiming to application in microflow analyses with the transport of the solutions in the microfluidic channels made only by capillary and gravitational action. The μ TED-1 was used in the simultaneous determination of acetaminophen and diclofenac by multiple pulse amperometry with electrodes composed of pencil leads. The μ TED-2 was employed in the chronoamperometric detection of naproxen, obtaining an analytical frequency of 208 injections per hour and a waste generation of only 40.0 μ L per analysis. In the μ TED-3, a glucose selective enzyme biosensor composed of poly (O-Toluidine) and glucose oxidase was integrated into the device, which was used to determine the glucose levels contained in tear samples. The μ TED-4 was used in the determination of mixtures containing ascorbic acid and dopamine by means of chromatographic separations made in the cotton threads (containing carboxylic groups) that makes up the microfluidic channel of the device and detection by chronoamperometry using Au electrodes also constructed directly on the threads of the microfluidic channel. In addition, the device was applied in the separation and selective determination of ascorbic acid and dopamine in tear samples. Finally, the μ TED-5 was built on a versatile and fully portable platform, containing a miniaturized chronoamperometric measurement system, which had electric power supplied by batteries and data transmission via USB or bluetooth. Three different types of electrodes were used in this device: graphite electrodes, screen printed electrode and Au electrodes. The microfluidic devices constructed in this work allowed the accomplishment of electrochemical analyses in microflow with a low cost, small waste generation and with a good analytical performance.

Keywords: microfluidic devices, cotton threads, electrochemical techniques, microflow analyses.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Evolução do número de trabalhos publicados ao longo dos anos com o termo <i>microfluidic</i> . Base de dados da busca: https://www.scopus.com/	27
Figura 2. Esquema geral das áreas de aplicação dos dispositivos microfluídicos.	32
Figura 3. Estrutura química das cadeias de celulose.	36
Figura 4. Camadas que compõe uma fibra de algodão, com montagem das estruturas feitas a partir de micrografias de microscopia eletrônica de varredura.	37
Figura 5. Esquema de classificação dos métodos de análise em fluxo.	40
Figura 6. Desenvolvimento histórico dos dispositivos microfluídicos, smartphones e dos dispositivos integrados.....	45
Figura 7. Forma de aplicação do potencial em função do tempo em medidas por (A) amperometria convencional e (B) amperometria de múltiplos pulsos.....	47
Figura 8. Mecanismo de resposta dos biossensores amperométricos enzimáticos de (A) primeira geração, (B) segunda geração e (C) terceira geração.....	50
Figura 9. Estrutura molecular do acetaminofeno.	52
Figura 10. Estrutura molecular do diclofenaco.	53
Figura 11. Estrutura molecular do naproxeno.....	54
Figura 12. Estrutura molecular do hidroclorotiazida.....	55
Figura 13. Organização geral dos biomarcadores, incluindo as principais fontes, categorias, sub-categorias e aplicações.	57
Figura 14. Estrutura molecular da D-glicose com (A) cadeia aberta e (B) cadeia fechada.	58
Figura 15. Estrutura molecular do ácido úrico.	60
Figura 16. Estrutura molecular do ácido ascórbico.....	61
Figura 17. Estrutura molecular da dopamina.....	62
Figura 18. Estrutura molecular da epinefrina.....	63
Figura 19. Esquema do processo de fabricação do μ TED-1 ilustrando os materiais que compõe o dispositivo e as etapas de montagem (representadas pelos números 1 a 7)...	68
Figura 20. Fotografia do μ TED-1 com as indicações dos principais componentes e do princípio de operação do dispositivo.	69
Figura 21. Ilustração do dispositivo após o processo de montagem mostrando as suas respectivas dimensões. No detalhe, micrografia de MEV da zona de detecção do μ TED-1.	69
Figura 22. Esquema do processo de construção do μ TED-2, ilustrando os materiais que compõe o dispositivo e as etapas de montagem (representadas pelos números 1 a 7)...	70

Figura 23. Fotografia do μ TED-2 com as indicações das principais regiões do dispositivo.	71
Figura 24. Processo de montagem do μ TED-3 (representados pelos números 1 a 10), incluindo o preparo de biossensor de PTB-GOx diretamente no dispositivo.	72
Figura 25. Reações envolvidas na incorporação de grupos carboxílicos aos fios de algodão através de tratamento com ácido cítrico.	73
Figura 26. Processo de fabricação do μ TED-4, sendo mostradas as etapas de preparação do canal microfluídico principal e da montagem do dispositivo com a integração de todos os componentes necessários.	74
Figura 27. Fotografia do μ TED-4 com a indicação das principais regiões, dimensões e componentes. Em detalhe, micrografia de MEV da zona de detecção do dispositivo, incluindo o tamanho dos eletrodos de Au. Corante alimentar laranja foi usado para uma melhor visualização dos componentes.	75
Figura 28. Circuito eletrônico do sistema de medida miniaturizado, com a indicação dos principais componentes.	78
Figura 29. Sistema eletrônico miniaturizado de medida em vista lateral e superior, com a indicação dos principais componentes e dimensões.	78
Figura 30. (A) Janela principal do programa Arduino 1.8.3 utilizada para a inserção das linhas de comando e (B) janela Monitor serial empregada para o monitoramento das análises via conexão USB.	79
Figura 31. Tela do aplicativo desenvolvido para o monitoramento e coleta dos dados das análises por conexão <i>bluetooth</i> com <i>smartphone</i>	80
Figura 32. Modelos 3D utilizados para a impressão das peças poliméricas que compõe o μ TED-5.	81
Figura 33. Fotografias da (A) base do dispositivo após o processo de montagem, com suas respectivas dimensões. (B) Parte traseira e (C) frontal da base, mostrando os componentes internos do μ TED-5.	82
Figura 34. Esquema da montagem do μ TED-5 contendo um sistema de detecção com eletrodos de grafite.	83
Figura 35. Fotografia do μ TED-5 pronto para o uso empregando eletrodos de grafite para detecção eletroquímica. Corante alimentar laranja foi usado para uma melhor visualização dos componentes do sistema.	83
Figura 36. Esquema da montagem do μ TED-5 contendo um sistema de detecção baseado em eletrodo impresso.	84
Figura 37. Fotografia do μ TED-5 pronto para o uso empregando um eletrodo impresso para a detecção eletroquímica. Corante alimentar laranja foi usado para uma melhor visualização dos componentes do sistema.	85

Figura 38. Esquema da montagem do μ TED-5 utilizado para a realização de separações cromatográficas e detecção eletroquímica baseada em eletrodos de Au.....	86
Figura 39. Fotografia do μ TED-5 pronto para o uso, contendo uma região de separação cromatográfica e eletrodos de Au para a detecção eletroquímica. Corante alimentar laranja foi usado para uma melhor visualização dos componentes do sistema.....	86
Figura 40. Configurações utilizadas para a avaliação da vazão no (A) μ TED-1 e no (B) μ TED-4.	89
Figura 41. Configuração utilizada para a avaliação da vazão no μ TED-2.	90
Figura 42. Configurações das análises de NPX no μ TED-2 por (A) injeção contínua e (B) injeções intermitentes para a avaliação da diluição do NPX no canal.	92
Figura 43. (A) Fotografia da gaze hidrófila de algodão utilizada na construção do μ TED-1; Conjunto de micrografias representativas de MEV: (B) pedaço da gaze hidrófila, (C) fios de algodão que compõe o canal microfluídico, seção transversal do (D) canal microfluídico e (E) de uma fibra de algodão.	95
Figura 44. Relação entre o volume de solução que passa pelo μ TED-1 e o tempo. As barras verticais representam o desvio padrão para quatro dispositivos avaliados. O coeficiente angular representa a vazão e o R^2 (coeficiente de correlação linear), indica a linearidade nos dados obtidos.	97
Figura 45. CVs obtidos com o μ TED-1 em PB 0,10 mol L ⁻¹ pH 7,4 antes (linha preta) e após a adição de (A) ACT ou (B) DCF (linhas vermelhas). As reações eletroquímicas correspondentes aos analitos também são mostradas. Eletrólito de suporte: PB 0,10 mol L ⁻¹ pH 7,4; velocidade de varredura: 100 mV s ⁻¹	98
Figura 46. CV obtido no μ TED-1 para uma mistura de 2,50 mmol L ⁻¹ de ACT e 2,50 mmol L ⁻¹ de DCF. Eletrólito de suporte: PB 0,10 mol L ⁻¹ pH 7,4; velocidade de varredura: 100 mV s ⁻¹	99
Figura 47. Cronoamperogramas obtidos em diferentes potenciais como μ TED-1 para a injeção de DCF e ACT. Eletrólito de suporte: PB 0,10 mol L ⁻¹ pH 7,4; volume de injeção: 2,0 μ L.	99
Figura 48. (A) Forma de aplicação dos pulsos de potencial para a medida de MPA e (B) sinais transientes obtidos para a injeção individual de DCF e ACT e para a mistura dos analitos. Eletrólito de suporte: PB: 0,10 mol L ⁻¹ pH 7,4; volume de injeção: 2,0 μ L.	100
Figura 49. Valores de corrente e desvios obtidos com o μ TED-1 por MPA para o (A) ACT e o (B) DCF. A linha pontilhada horizontal indica o valor médio das correntes obtidas. Pulsos de potencial aplicados: 0,25 V / 500 ms e 0,50 V / 500 ms; eletrólito de suporte: PB 0,10 mol L ⁻¹ pH 7,4; volume de injeção: 2,0 μ L.....	102
Figura 50. (A) Respostas obtidas por MPA no μ TED-1 para injeções (n = 3) de soluções contendo (I) apenas 40,0 μ mol L ⁻¹ de ACT (para o calculo do CF) e (II-VII) soluções	

contendo a mistura de ACT e DCF entre 10,0 e 320,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Pulsos de potencial aplicados: 0,25 V / 500 ms e 0,50 V / 500 ms; eletrólito de suporte: PB 0,10 mol L^{-1} pH 7,4; volume de injeção: 2,0 μL . (B) Curvas de calibração para ACT e DCF, as quais correspondem as respostas obtidas por MPA em A.	103
Figura 51. (A) Micrografia representativa de MEV com elétrons retroespalhados das fibras de algodão. (B) Espectro de EDS e (C-D) mapeamentos químicos elementar da área mostrada em A.	105
Figura 52. (A) Espectro Raman obtido das fibras de algodão com a indicação das principais atribuições das bandas vibracionais. (B) Mapeamento Raman do grupo OH de uma fibra de algodão.	106
Figura 53. CVs obtidos no $\mu\text{TED-2}$ na ausência (linha preta) e na presença (linha vermelha) de 1,0 mmol L^{-1} de NPX. As reações de oxidação eletroquímica do NPX (processos I e II) e os respectivos produtos formados também são mostrados. Eletrólito de suporte: PB 0,10 mol L^{-1} pH 7,4. Velocidade de varredura: 50 mV s^{-1}	108
Figura 54. Características do $\mu\text{TED-2}$ avaliadas e otimizadas (indicadas pelas letras a-g) para a realização de μFIA com detecção cronoamperométrica.	109
Figura 55. Razão sinal/ruído (S/N) para a determinação de 50,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de NPX por cronoamperometria para potenciais de oxidação entre 0,70 e 0,95 V. Eletrólito de suporte: PB 0,10 mol L^{-1} pH 7,4; volume de injeção: 2,0 μL	110
Figura 56. Influência da diferença de altura entre os reservatórios de entrada e saída do $\mu\text{TED-2}$ nos valores de corrente obtidos para a determinação de 50,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de NPX por cronoamperometria. Potencial aplicado: 0,85 V; eletrólito de suporte: PB 0,10 mol L^{-1} pH 7,4; volume de injeção: 2,0 μL	110
Figura 57. Valores de corrente obtidos para a determinação de 50,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de NPX por cronoamperometria em dispositivos compostos por canais contendo de 6 a 11 fios de algodão. Potencial aplicado: 0,85 V; eletrólito de suporte: PB 0,10 mol L^{-1} pH 7,4; volume de injeção: 2,0 μL	111
Figura 58. Relação entre o número de torções dos fios do canal microfluídico e os valores de corrente obtidos na determinação de 50,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de NPX. Potencial aplicado: 0,85 V; eletrólito de suporte: PB 0,10 mol L^{-1} pH 7,4; volume de injeção: 2,0 μL	112
Figura 59. Efeito da distância entre o local de injeção e a zona de detecção nas respostas de corrente obtidas para a determinação de 50,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de NPX no $\mu\text{TED-2}$. Potencial aplicado: 0,85 V; eletrólito de suporte: PB 0,10 mol L^{-1} pH 7,4; volume de injeção: 2,0 μL	113

Figura 60. Influência do volume de injeção da amostra nas respostas cronoamperométricas para a detecção de 50,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de NPX. Potencial aplicado: 0,85 V; eletrólito de suporte: PB 0,10 mol L^{-1} pH 7,4.....	113
Figura 61. Efeito da largura da zona de detecção do $\mu\text{TED-2}$ nos sinais obtidos para a determinação de 50,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de NPX. Potencial aplicado: 0,85 V; eletrólito de suporte: PB 0,10 mol L^{-1} pH 7,4; volume de injeção: 2,0 μL	114
Figura 62. Visualização 3D do canal do $\mu\text{TED-2}$ reconstruído a partir de imagens obtidas por microtomografia de raios-X.....	115
Figura 63. Cronoamperogramas obtidos para injeção contínua e injeções intermitentes de NPX no $\mu\text{TED-2}$. Potencial aplicado: 0,85 V.	117
Figura 64. Valores de corrente e RSDs obtidos na determinação de NPX com o $\mu\text{TED-2}$ para os estudos de (A) repetibilidade e (B) reprodutibilidade. A linha pontilhada horizontal indica o valor médio das correntes obtidas. Potencial aplicado: 0,85 V; eletrólito de suporte: PB 0,10 mol L^{-1} pH 7,4; volume de injeção: 2,0 μL	117
Figura 65. (A) Respostas cronoamperométricas obtidas com o $\mu\text{TED-2}$ para injeções ($n = 3$) de NPX na faixa entre 1,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 1,0 mmol L^{-1} . No detalhe, os sinais transientes das cinco menores concentrações de NPX injetadas (1,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ – 10,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$). Potencial aplicado: 0,85 V; eletrólito de suporte: PB 0,10 mol L^{-1} pH 7,4; volume de injeção: 2,0 μL . (B) Curvas de calibração correspondentes aos valores de correntes obtidos em A.....	118
Figura 66. (A) Sinais transientes obtidos por μFIA no $\mu\text{TED-2}$ para injeções de soluções de NPX padrão com concentrações entre 1,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 1,0 mmol L^{-1} e injeções das amostras de comprimidos (indicadas pelas letras I-III). No detalhe, os sinais transientes das três menores concentrações de NPX injetadas (1,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ – 10,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$). Potencial aplicado: 0,85 V; eletrólito de suporte: PB 0,10 mol L^{-1} pH 7,4; volume de injeção: 2,0 μL . (B) Curva de calibração correspondente aos valores de correntes obtidos em A para o NPX padrão.....	120
Figura 67. CV realizada em solução contendo 5,0 mmol L^{-1} de TB e 10,0 mg mL^{-1} de GOx para a construção do biossensor de PTB-GOx. As reações e espécies geradas durante o processo também são mostradas. Velocidade de varredura: 50 mV s^{-1}	121
Figura 68. CV do biossensor de PTB-GOx integrado ao $\mu\text{TED-3}$ obtido em PB 0,10 mol L^{-1} pH 7,4. Velocidade de varredura: 50 mV s^{-1}	122
Figura 69. Caracterizações representativas de MEV, incluindo micrografias e reconstruções 3D da topografia e da rugosidade do (A) eletrodo de grafite e do (B) biossensor de PTB-GOx.	123

Figura 70. (A) Micrografia de MEV com elétrons secundários e mapeamento químico de EDS da superfície do biossensor de PTB-GOx obtida para o (B) nitrogênio e para o (C) enxofre.....	124
Figura 71. (A) Espectros Raman obtidos da superfície do eletrodo de grafite e do biossensor de PTB-GOx. (B) Mapeamento Raman da superfície do biossensor de PTB-GOx para a faixa entre 440-515 cm^{-1}	124
Figura 72. Mecanismo de detecção de glicose no biossensor de PTB-GOx integrado ao $\mu\text{TED-3}$	126
Figura 73. Respostas cronoamperométricas obtidas com eletrodo de PTB (linha preta) e biossensor de PTB-GOx (linha vermelha) para injeções de glicose entre 1,0 e 25,0 mmol L^{-1} . Potencial aplicado: -0,55 V; eletrólito de suporte: PB 0,10 mol L^{-1} pH 7,4; volume de injeção: 2,0 μL	127
Figura 74. Influência da quantidade de GOx utilizada na solução de preparo do biossensor de PTB-GOx na resposta eletroquímica para 2,50 mmol L^{-1} de glicose. Potencial aplicado: -0,55 V; eletrólito de suporte: PB 0,10 mol L^{-1} pH 7,4; volume de injeção: 2,0 μL	128
Figura 75. Efeito do pH de preparo do biossensor de PTB-GOx nas respostas cronoamperométricas para 2,50 mmol L^{-1} de glicose. Potencial aplicado: -0,55 V; eletrólito de suporte: PB 0,10 mol L^{-1} pH 7,4; volume de injeção: 2,0 μL	128
Figura 76. Variação de corrente para 2,50 mmol L^{-1} de glicose com o número de ciclos de CV utilizados no preparo dos biossensores de PTB-GOx. Potencial aplicado: -0,55 V; eletrólito de suporte: PB 0,10 mol L^{-1} pH 7,4; volume de injeção: 2,0 μL	129
Figura 77. Efeito do potencial aplicado na determinação de 2,50 mmol L^{-1} de glicose com o $\mu\text{TED-3}$. Eletrólito de suporte: PB 0,10 mol L^{-1} pH 7,4; volume de injeção: 2,0 μL	129
Figura 78. (A) Sinais transientes obtidos para injeções ($n = 3$) de soluções de glicose com concentrações entre 0,075 e 7,5 mmol L^{-1} empregando o biossensor de PTB-GOx integrado ao $\mu\text{TED-3}$. No detalhe, os sinais transientes das quatro menores concentrações de glicose injetadas (0,075 – 0,5 mmol L^{-1}). Potencial aplicado: -0,55 V; eletrólito de suporte: PB 0,10 mol L^{-1} pH 7,4; volume de injeção: 2,0 μL . (B) Curvas de calibração construídas com os valores de corrente obtidos em A.	130
Figura 79. Valores de corrente e RSDs obtidos para o estudo de (A) repetibilidade e (B) reprodutibilidade na determinação de glicose com $\mu\text{TED-3}$. Potencial aplicado: -0,55 V; eletrólito de suporte: PB 0,10 mol L^{-1} pH 7,4; volume de injeção: 2,0 μL	132
Figura 80. Estabilidade da resposta do biossensor de PTB-GOx integrado ao $\mu\text{TED-3}$ para as determinações de glicose ao longo de 31 dias. Potencial aplicado: -0,55 V; eletrólito de suporte: PB 0,10 mol L^{-1} pH 7,4; volume de injeção: 2,0 μL	132

Figura 81. Efeito das espécies potencialmente interferentes nas respostas obtidas com o biossensor de PTB-GOx para a glicose. As análises foram realizadas com as seguintes soluções: (A) apenas 0,50 mmol L⁻¹ de glicose; (B) 0,50 mmol L⁻¹ de glicose + 10,0 mmol L⁻¹ de lactato; (C) 0,50 mmol L⁻¹ de glicose + 10,0 mmol L⁻¹ de ureia; (D) 0,50 mmol L⁻¹ de glicose + 50,0 µmol L⁻¹ de ácido ascórbico; (E) 0,50 mmol L⁻¹ de glicose + 10,0 mmol L⁻¹ de lactato + 10,0 mmol L⁻¹ de ureia + 50,0 µmol L⁻¹ de ácido ascórbico. Potencial aplicado: -0,55 V; eletrólito de suporte: PB 0,10 mol L⁻¹ pH 7,4; volume de injeção: 2,0 µL.

.....133

Figura 82. Gráfico de correlação entre os níveis de glicose medidos em lágrima e no sangue de 10 voluntários não-diabéticos.....134

Figura 83. Micrografias representativas de MEV com elétrons secundários da superfície de uma fibra de algodão (A-B) não tratada e (C-D) tratada com ácido cítrico.135

Figura 84. Espectros de FTIR obtidos dos fios de algodão não tratados e tratados pelo processo de esterificação com ácido cítrico. Os números de onda e as atribuições das principais bandas também são indicadas.....136

Figura 85. Espectros Raman obtido dos fios de algodão antes e após o tratamento com ácido cítrico, mostrando (A) os espectros completos (faixa entre 40 e 3800 cm⁻¹) e (B) apenas a região que compreende o estiramento do grupo carbonila. (C) Mapeamento Raman da faixa de estiramento do grupo carbonila presentes numa fibra de algodão tratada.137

Figura 86. CV obtido em H₂SO₄ 0,50 mol L⁻¹ com os eletrodos de Au construídos no canal microfluídico do µTED-4. Velocidade de varredura: 50 mV s⁻¹.....139

Figura 87. Análises de CV realizadas no µTED-4 com eletrodos de Au para o eletrólito de suporte (provas em branco) e para (A) 1,0 mmol L⁻¹ de AA ou (B) 1,0 mmol L⁻¹ de DA. As reações eletroquímicas correspondentes ao AA e DA também são mostradas. Eletrólito de suporte: tampão acetato 0,10 mol L⁻¹ pH 3,8; velocidade de varredura: 50 mV s⁻¹....139

Figura 88. CVs obtidos no µTED-4 com eletrodos de Au contendo apenas o eletrólito de suporte (linha preta) e uma mistura de 1,0 mmol L⁻¹ de AA e 1,0 mmol L⁻¹ de DA (linha vermelha). Eletrólito de suporte: tampão acetato 0,10 mol L⁻¹ pH 3,8; velocidade de varredura: 50 mV s⁻¹.140

Figura 89. Parâmetros da metodologia e do µTED-4 avaliados e otimizados (indicadas pelas letras a-h) para a realização de separações cromatográficas e detecção de AA e DA por cronoamperometria.....141

Figura 90. Eluições isocráticas de 1,0 mmol L⁻¹ de AA + 1,0 mmol L⁻¹ de DA empregando o µTED-4 com fases móveis compostas por tampão acetato pH 3,8 com forças iônicas entre 1,0 mmol L⁻¹ e 1,0 mol L⁻¹ em R_i e C_{ax1} e 1,0 mol L⁻¹ em C_{ax2} em todas as análises. Potencial aplicado: 0,60 V; volume de injeção: 1,0 µL.142

Figura 91. Respostas cronoamperométricas obtidas no μ TED-4 para 1,0 mmol L ⁻¹ de AA + 1,0 mmol L ⁻¹ de DA com fases móveis compostas por tampão acetato pH 3,8 com diferentes FI empregando (A) eluição por gradiente e (B) eluição isocrática. Potencial aplicado: 0,60 V; volume de injeção: 1,0 μ L.....	143
Figura 92. Efeito da distância de injeção nas respostas obtidas com o μ TED-4 para 1,0 mmol L ⁻¹ de AA + 1,0 mmol L ⁻¹ de DA. Potencial aplicado: 0,60 V; eletrólito de suporte: tampão acetato pH 3,8; volume de injeção: 1,0 μ L.	144
Figura 93. Influência do potencial de oxidação para a detecção cronoamperométrica de 1,0 mmol L ⁻¹ de AA + 1,0 mmol L ⁻¹ de DA. Eletrólito de suporte: tampão acetato pH 3,8; volume de injeção: 1,0 μ L.	145
Figura 94. Relação entre o número de torções por metro dos fios de C_m e as correntes obtidas para a determinação de 1,0 mmol L ⁻¹ de AA + 1,0 mmol L ⁻¹ de DA por cronoamperometria. Potencial aplicado: 0,60 V; eletrólito de suporte: tampão acetato pH 3,8; volume de injeção: 1,0 μ L.	146
Figura 95. Efeito do número de fios que compõe C_m nas (A) intensidades de corrente obtidas para 1,0 mmol L ⁻¹ de AA + 1,0 mmol L ⁻¹ de DA por cronoamperometria e (B) na largura dos sinais transientes correspondente a cada analito. Potencial aplicado: 0,60 V; eletrólito de suporte: tampão acetato pH 3,8; volume de injeção: 1,0 μ L.	146
Figura 96. Valores de correntes obtidas para 1,0 mmol L ⁻¹ de AA + 1,0 mmol L ⁻¹ de DA com a variação do volume de injeção dos analitos. Potencial aplicado: 0,60 V; eletrólito de suporte: tampão acetato pH 3,8.	147
Figura 97. Influência do tempo de equilíbrio na eficiência das separações cromatográficas de 1,0 mmol L ⁻¹ de AA + 1,0 mmol L ⁻¹ de DA realizadas no μ TED-4. Potencial aplicado: 0,60 V; eletrólito de suporte: tampão acetato pH 3,8; volume de injeção: 2,0 μ L.	148
Figura 98. Relação entre o volume de solução transportado em C_m , C_{ax1} e C_{ax2} e o tempo, com a indicação dos coeficientes angulares obtidos nos canais microfluídicos do μ TED-4 durante 30 minutos de avaliação.	149
Figura 99. Respostas cronoamperométricas obtidas com o μ TED-4 para soluções contendo misturas de AA e DA em tampão acetato pH 3,8, com as seguintes concentrações de ambas as espécies: (I) 0,00, (II) 0,025, (III) 0,05, (IV) 0,10, (V) 0,25, (VI) 0,50, (VII) 1,00, (VIII) 2,50 e (IX) 5,00 mmol L ⁻¹ . No detalhe, são mostrados os sinais referentes as menores concentrações (I-V) dos analitos. (B) Curvas de calibração construídas a partir das respostas obtidas em A. Potencial aplicado: 0,60 V; eletrólito de suporte: tampão acetato pH 3,8; volume de injeção: 2,0 μ L.....	150
Figura 100. Valores de corrente e RSDs obtidos com o μ TED-4 nas análises de uma mistura de 1,0 mmol L ⁻¹ de AA e 1,0 mmol L ⁻¹ de DA para (A-B) 10 injeções consecutivas	

e para (C-D) 5 dispositivos diferentes. A linha pontilhada horizontal indica o valor médio das correntes obtidas. Potencial aplicado: 0,60 V; eletrólito de suporte: tampão acetato pH 3,8; volume de injeção: 2,0 μL152

Figura 101. Variações nas respostas obtidas com o $\mu\text{TED-4}$ para a detecção de AA e DA em soluções contendo espécies potencialmente interferentes, com as seguintes concentrações: (a) 0,50 mmol L^{-1} de AA + 0,50 mmol L^{-1} de DA; (b) 0,50 mmol L^{-1} de AA + 0,50 mmol L^{-1} de DA + 0,50 mmol L^{-1} de glicose; (c) 0,50 mmol L^{-1} de AA + 0,50 mmol L^{-1} de DA + 10,0 mmol L^{-1} de lactato; (d) 0,50 mmol L^{-1} de AA + 0,50 mmol L^{-1} de DA + 10,0 mmol L^{-1} de ureia; (e) 0,50 mmol L^{-1} de AA + 0,50 mmol L^{-1} de DA + 0,50 mmol L^{-1} de glicose + 10,0 mmol L^{-1} de lactato + 10,0 mmol L^{-1} de ureia. Potencial aplicado: 0,60 V; eletrólito de suporte: tampão acetato pH 3,8; volume de injeção: 2,0 μL153

Figura 102. Diagrama em blocos mostrando os principais componentes empregados nas análises eletroquímicas realizadas com o $\mu\text{TED-5}$155

Figura 103. (A) Circuito teste empregado nas avaliação dos equipamentos com a indicação dos valores e tolerância dos seus componentes. Linha base e valor de SD para o (B) potenciostato comercial e (C) com o sistema eletrônico miniaturizado.157

Figura 104. CVs obtidos com os eletrodos de grafite integrados no $\mu\text{TED-5}$ para o eletrólito de suporte (linha preta) e para uma solução contendo 1,0 mmol L^{-1} de UA. A reação de oxidação do UA também é mostrada. Eletrólito de suporte: PB 0,10 mol L^{-1} pH 7,4; velocidade de varredura: 50 mV s^{-1}158

Figura 105. Respostas cronoamperométricas obtidas para injeções ($n = 3$) de UA com leitura realizada pelo (A) potenciostato comercial ou pelo sistema eletrônico miniaturizado do $\mu\text{TED-5}$ com transmissão dos dados (B) via USB ou (C) *bluetooth*. Potencial aplicado: 0,50 V; eletrólito de suporte: PB 0,10 mol L^{-1} pH 7,4; volume de injeção: 2,0 μL159

Figura 106. Valores de corrente e RSD obtidos com eletrodos de grafite integrados ao $\mu\text{TED-5}$ para injeções ($n = 10$) de 50,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de UA. Potencial aplicado: 0,50 V; eletrólito de suporte: PB 0,10 mol L^{-1} pH 7,4; volume de injeção: 2,0 μL161

Figura 107. (A) Sinais transientes obtidos para injeções ($n = 3$) de UA com concentrações entre 5,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 1,0 mmol L^{-1} empregando eletrodos de grafite e o sistema eletrônico miniaturizado do $\mu\text{TED-5}$. No detalhe, os sinais transientes das três menores concentrações de UA injetadas (5,0 – 50,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$). Potencial aplicado: 0,50 V; eletrólito de suporte: PB 0,10 mol L^{-1} pH 7,4; volume de injeção: 2,0 μL . (B) Curvas de calibração construídas com os valores de corrente obtidos em A.161

Figura 108. CVs obtidos com o SPE integrado no $\mu\text{TED-5}$ para o eletrólito de suporte (linha preta) e para solução contendo 1,0 mmol L^{-1} de HCZ. A reação de oxidação do HCZ também é mostrada. Eletrólito de suporte: PB 0,10 mol L^{-1} pH 7,4; velocidade de varredura: 50 mV s^{-1}164

Figura 109. Respostas cronoamperométricas obtidas com o SPE para injeções (n = 3) de HCZ com leitura realizada pelo (A) potenciostato comercial ou pelo sistema eletrônico miniaturizado do μ TED-5 com transmissão dos dados (B) via USB ou (C) <i>bluetooth</i> . Potencial aplicado: 0,80 V; eletrólito de suporte: PB 0,10 mol L ⁻¹ pH 7,4; volume de injeção: 2,0 μ L.	164
Figura 110. Valores de corrente e RSD obtidos com o SPE integrado ao μ TED-5 para injeções (n = 10) de 75,0 μ mol L ⁻¹ de HCZ. Potencial aplicado: 0,80 V; eletrólito de suporte: PB 0,10 mol L ⁻¹ pH 7,4; volume de injeção: 2,0 μ L.	166
Figura 111. (A) Sinais transientes obtidos para injeções (n = 3) de HCZ com concentrações entre 5,0 e 750,0 μ mol L ⁻¹ empregando um SPE integrado ao μ TED-5. No detalhe, os sinais transientes das três menores concentrações de HCZ injetadas (5,0 – 50,0 μ mol L ⁻¹). Potencial aplicado: 0,80 V; eletrólito de suporte: PB 0,10 mol L ⁻¹ pH 7,4; volume de injeção: 2,0 μ L. (B) Curvas de calibração construídas com os valores de corrente obtidos em A.	166
Figura 112. CVs obtidos com os eletrodos de Au integrados no μ TED-5 para o eletrólito de suporte (linhas pretas) e para (A) 1,0 mmol L ⁻¹ de AA e (B) 1,0 mmol L ⁻¹ de EP (linhas vermelhas). As reações de oxidação das espécies também são mostradas. Eletrólito de suporte: tampão acetato 0,10 mol L ⁻¹ pH 3,8; velocidade de varredura: 50 mV s ⁻¹	169
Figura 113. CVs obtidos com os eletrodos de Au integrados ao μ TED-5 para o eletrólito de suporte (linha preta) e para uma mistura de 1,0 mmol L ⁻¹ de AA e 1,0 mmol L ⁻¹ de EP (linha vermelha). Eletrólito de suporte: tampão acetato 0,10 mol L ⁻¹ pH 3,8; velocidade de varredura: 50 mV s ⁻¹	170
Figura 114. Respostas cronoamperométricas obtidas com eluição por gradiente para injeções (n = 2) de solução contendo 1,0 mmol L ⁻¹ de AA e 1,0 mmol L ⁻¹ de EP com leitura realizada pelo (A) potenciostato comercial ou pelo sistema eletrônico miniaturizado integrado ao μ TED-5 com transmissão dos dados (B) via USB ou (C) <i>bluetooth</i> . Potencial aplicado: 0,60 V; eletrólito de suporte: tampão acetato pH 3,8; volume de injeção: 2,0 μ L.	171
Figura 115. Valores de corrente e RSDs obtidos com os eletrodos de Au integrados ao μ TED-5 para 1,0 mmol L ⁻¹ de AA e 1,0 mmol L ⁻¹ de EP. Potencial aplicado: 0,60 V; eletrólito de suporte: tampão acetato pH 3,8; volume de injeção: 2,0 μ L.	172
Figura 116. (A) Sinais transientes obtidos com os eletrodos de Au integrados ao sistema de medida do μ TED-5 para a separação e detecção eletroquímica de soluções contendo misturas de AA e EP com as seguintes concentrações de ambas as espécies: (I) 0,00, (II) 0,10, (III) 0,25, (IV) 0,50, (V) 0,75, (VI) 1,00 e (VII) 2,50 mmol L ⁻¹ . (B) Curvas de calibração construídas a partir das respostas obtidas em A. Potencial aplicado: 0,60 V; eletrólito de suporte: tampão acetato pH 3,8; volume de injeção: 2,0 μ L.	173

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Relação de reagentes utilizados nos experimentos do projeto.....	66
Tabela 2. Componentes utilizados na montagem do sistema eletrônico miniaturizado de medida.....	77
Tabela 3. Custo estimado dos materiais empregados na fabricação do μ TED-1.....	96
Tabela 4. Comparação dos valores de LD e faixa linear para a determinação de ACT e DCF com o μ TED-1 e com outros dispositivos relatados na literatura.....	104
Tabela 5. Bandas vibracionais e atribuições correspondentes observadas nos fios de algodão que compõe o canal microfluídico do μ TED-2.	107
Tabela 6. Características do canal microfluídico que compõe o μ TED-2 obtidas por microtomografia de raios-X.	115
Tabela 7. Faixas lineares e LDs obtidos com o μ TED-2 e em trabalhos na literatura para a determinação eletroquímica de NPX.....	119
Tabela 8. Determinação de NPX em amostras farmacêuticas com o μ TED-2.	120
Tabela 9. Atribuições das bandas Raman para o grafite, PTB e GOx.	125
Tabela 10. Comparação do desempenho analítico do μ TED-3/biossensor de PTB-GOx com outros biossensores relatados na literatura para a determinação eletroquímica de glicose.	131
Tabela 11. Bandas de absorção no infravermelho e atribuições correspondentes observadas nos fios de algodão antes e após o tratamento com ácido cítrico.	136
Tabela 12. Comparação da faixa linear e LDs obtidos para separação e detecção do AA e DA com o μ TED-4 e com outros trabalhos apresentados na literatura.....	151
Tabela 13. Resultados das análises realizadas com o μ TED-4 para a determinação de AA e DA em amostras de lágrimas.	154
Tabela 14. Descrição do custo dos componentes utilizados na construção do μ TED-5.....	156
Tabela 15. Consumo de energia estimada dos principais componentes do μ TED-5.	156
Tabela 16. Comparação dos valores de corrente e SD da linha base obtidos com os eletrodos de grafite para a detecção de UA com o potenciostato comercial e com o sistema eletrônico miniaturizado do μ TED-5 com transmissão dos dados via USB ou <i>bluetooth</i>	160
Tabela 17. Comparação da faixa linear e LD obtidos para a determinação de UA pelos eletrodos de grafite integrados ao μ TED-5 com outros trabalhos na literatura.	162
Tabela 18. Comparação dos valores de corrente e SD da linha base obtidos com o SPE para a detecção da HCZ com o potenciostato comercial e com o sistema eletrônico miniaturizado do μ TED-5 com transmissão dos dados via USB ou <i>bluetooth</i>	165

Tabela 19. Comparação da faixa linear e LD obtidos para a determinação de HCZ com o SPE integrado ao μ TED-5 e com outros trabalhos na literatura.	167
Tabela 20. Comparação dos valores de corrente e SD da linha base obtidos com os eletrodos de Au para a separação e detecção de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de AA e $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de EP com o potenciostato comercial e com o sistema eletrônico miniaturizado do μ TED-5 com transmissão dos dados via USB ou <i>bluetooth</i>	171
Tabela 21. Comparação da faixa linear e LDs obtidos para a separação e detecção de AA e EP com os eletrodos de Au integrados ao μ TED-5 e com outros trabalhos da literatura.....	174
Tabela 22. Custo final dos dispositivos microfluídicos com base nos valores dos materiais empregados na construção.....	176

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA – Ácido ascórbico
ABS – Acrilonitrilo-butadieno-estireno
ACT – Acetaminofeno
AdSDPV – Voltametria adsortiva de redissolução catódica com pulso diferencial
AmpOp – Amplificadores operacionais
 C_{ax1} – Canal microfluídico auxiliar 1
 C_{ax2} – Canal microfluídico auxiliar 2
CE – Contra eletrodo
CF – Fator de correção
 C_m - Canal microfluídico principal
CV – Voltametria cíclica
D – Coeficiente de dispersão
DA – Dopamina
DCF - Diclofenaco
DPV – Voltametria de pulso diferencial
EDS – Espectroscopia de raios-X por energia dispersiva
EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético
EP – Epinefrina
ESI – Ionização por electrospray
FI – Força iônica
FIA – Análise por injeção em fluxo
FTIR – Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier
GAC – *Green Analytical Chemistry*
GDH-FAD – Glicose desidrogenase com flavina adenina dinucleotídeo
GOx – Glicose oxidase
HCZ - Hidroclorotiazida
HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência
LC – Cromatografia líquida
LD – Limite de detecção
LED – *Light Emitting Diode*
LOC – *Lab-on-a-chip*
LQ – Limite de quantificação
MALDI – Ionização e dessorção a laser assistida por matriz
MEV – Microscopia eletrônica de varredura
MPA – Amperometria de múltiplos pulsos

NPX – Naproxeno
PB – Tampão fosfato
PC – Policarbonato
PDMS – Poli(dimetilsiloxano)
Pe – Número de Péclet
PET – Polietileno tereftalato
PMMA – Polimetilmetacrilato
PS – Poliestireno
PTB – Poli(O-Toluidina)
PVC – Cloreto de polivinila
QCM – Microbalança de cristal de quartzo
 R^2 – Coeficiente de correlação linear
Ra – Rugosidade média
 R_{ax1} – Reservatório de entrada auxiliar 1
 R_{ax2} – Reservatório de entrada auxiliar 2
RE – Eletrodo de referência
Re – Número de Reynolds
 R_i – Reservatório de entrada principal
 R_o – Reservatório de saída
RSD – Desvio padrão relativo
SD – Desvio padrão
SERS – Espectroscopia Raman amplificada por superfície
SPE – Eletrodo impresso
SVR – *Surface-to-volume-ratio*
SWV – Voltametria de onda quadrada
TB – Azul de O-toluidina
TLS – Espectrometria de lente térmica
UA – Ácido úrico
WE – Eletrodo de trabalho
 μ FIA – Análise por injeção em microfluxo
 μ TAS – *Micro total analysis system*
 μ TED – Dispositivo microfluídico eletroanalítico baseado em fios de algodão
 μ TED-1 – Dispositivo microfluídico eletroanalítico baseado em fios de algodão – versão 1
 μ TED-2 – Dispositivo microfluídico eletroanalítico baseado em fios de algodão – versão 2
 μ TED-3 – Dispositivo microfluídico eletroanalítico baseado em fios de algodão – versão 3
 μ TED-4 – Dispositivo microfluídico eletroanalítico baseado em fios de algodão – versão 4
 μ TED-5 – Dispositivo microfluídico eletroanalítico baseado em fios de algodão – versão 5

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	24
1.1 MICROFLUÍDICA	26
1.2 DISPOSITIVOS MICROFLUÍDICOS	27
1.2.1 Características	28
1.2.2 Funções e aplicações	29
1.2.3 Materiais	33
1.3 FIOS DE ALGODÃO	35
1.3.1 Dispositivos microfluídicos baseados em fios de algodão	37
1.4 ANÁLISES EM FLUXO MINIATURIZADAS	39
1.5 INTEGRAÇÃO E PORTABILIDADE EM DISPOSITIVOS MICROFLUÍDICOS	43
1.6 TÉCNICAS ELETROQUÍMICAS	46
1.6.1 Técnicas amperométricas	46
1.7 DETECÇÃO DE FÁRMACOS	52
1.7.1 Acetaminofeno e diclofenaco	52
1.7.2 Naproxeno	54
1.7.3 Hidroclorotiazida	55
1.8 DETECÇÃO DE BIOMARCADORES	56
1.8.1 Glicose	58
1.8.2 Ácido úrico	60
1.8.3 Ácido ascórbico, dopamina e epinefrina	61
2 OBJETIVO GERAL	65
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	65
3 MATERIAIS E MÉTODOS	66
3.1 REAGENTES	66
3.2 CONSTRUÇÃO E FUNCIONAMENTO DOS μ TEDs	67
3.2.1 Parte I – μ TED-1	67
3.2.2 Parte II – μ TED-2	70
3.2.3 Parte III – μ TED-3	71
3.2.4 Parte IV – μ TED-4	72
3.2.5 Parte V – μ TED-5	76
3.2.5.1 Sistema eletrônico miniaturizado de medida	76
3.2.5.2 Recepção e gerenciamento das análises	79
3.2.5.3 Construção da base e dos acessórios do μ TED-5	80
3.2.5.4 Montagem do μ TED-5	81
3.3 CARACTERIZAÇÕES SUPERFICIAIS	87

3.3.1 Quantificação dos grupos carboxílicos	88
3.4 AVALIAÇÕES DAS VAZÕES NOS DISPOSITIVOS	89
3.5 MEDIDAS ELETROQUÍMICAS	90
3.6 AVALIAÇÃO DA DILUIÇÃO DA AMOSTRA NO CANAL MICROFLUÍDICO	91
3.7 DETERMINAÇÕES EM AMOSTRAS REAIS	92
3.7.1 Determinação de naproxeno em formulações farmacêuticas	92
3.7.2 Determinação dos níveis de glicose, ácido ascórbico e dopamina em lágrimas	93
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	94
4.1 PARTE I – μ TED-1	94
4.1.1 Materiais	94
4.1.2 Avaliação do custo do dispositivo	95
4.1.3 Determinação da vazão	96
4.1.4 Comportamento eletroquímico do acetaminofeno e diclofenaco	97
4.1.5 Determinação de acetaminofeno e diclofenaco por amperometria de múltiplos pulsos	100
4.1.6 Desempenho analítico do μ TED-1 para a determinação de acetaminofeno e diclofenaco	101
4.2 PARTE II – μ TED-2	104
4.2.1 Caracterizações superficiais do canal microfluídico	105
4.2.2 Comportamento eletroquímico do naproxeno	107
4.2.3 Avaliação e otimização do μ TED-2 para μ FIA	108
4.2.4 Caracterização do μ TED-2	114
4.2.5 Desempenho analítico do μ TED-2 para a determinação de naproxeno	118
4.2.6 Determinação de naproxeno em formulações farmacêuticas	119
4.3 PARTE III – μ TED-3	120
4.3.1 Construção do biossensor de PTB-GOx	121
4.3.2 Caracterizações superficiais dos eletrodos	123
4.3.3 Avaliação da resposta eletroquímica para glicose	125
4.3.4 Avaliação e otimização das condições experimentais	127
4.3.5 Desempenho analítico do μ TED-3 para a determinação de glicose	130
4.3.6 Determinação dos níveis de glicose em lágrima e sangue	133
4.4 PARTE IV – μ TED-4	134
4.4.1 Avaliação do tratamento nos fios de algodão	135
4.4.2 Caracterização eletroquímica dos eletrodos de ouro	138
4.4.3 Avaliação e otimização das condições experimentais	141
4.4.4 Caracterização do μ TED-4	148

4.4.5 Desempenho analítico do μ TED-4 para a separação e determinação de ácido ascórbico e dopamina.....	150
4.4.6 Determinação de ácido ascórbico e dopamina em amostras de lágrimas	153
4.5 PARTE V – μ TED-5	154
4.5.1 Características do μ TED-5.....	155
4.5.2 Determinação de ácido úrico com eletrodos de grafite	158
4.5.2.1 Comportamento eletroquímico do ácido úrico	158
4.5.2.2 Comparação das respostas cronoamperométricas nos eletrodos de grafite	159
4.5.2.3 Desempenho analítico do μ TED-5 para a determinação de ácido úrico	160
4.5.3 Determinação de hidroclorotiazida com eletrodo impresso	163
4.5.3.1 Comportamento eletroquímico da hidroclorotiazida.....	163
4.5.3.2 Comparação das respostas cronoamperométricas do eletrodo impresso	164
4.5.3.3 Desempenho analítico do μ TED-5 para a determinação de hidroclorotiazida	165
4.5.4 Separação cromatográfica e determinação de ácido ascórbico e epinefrina com eletrodos de ouro.....	168
4.5.4.1 Comportamento eletroquímico do ácido ascórbico e epinefrina	168
4.5.4.2 Comparação das respostas cronoamperométricas com eletrodos de ouro	170
4.5.4.3 Desempenho analítico do μ TED-5 para a separação e determinação de ácido ascórbico e epinefrina.....	172
5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	176
REFERÊNCIAS	178
ANEXO I.....	216
ANEXO II.....	217

1 INTRODUÇÃO

A microfluídica é o campo da pesquisa que envolve a manipulação precisa de pequenos volumes de líquidos em canais com dimensões micrométricas, permitindo o desenvolvimento de dispositivos microfluídicos de análise com tamanho extremamente reduzido.

A utilização de sistemas miniaturizados é uma tendência evidente no nosso cotidiano e em muitas áreas da ciência (inclusive na química), com os dispositivos microfluídicos trazendo uma série de vantagens, facilidades e aprimoramentos às técnicas analíticas.¹ Dentre todas, as análises em fluxo estão entre as técnicas que mais se beneficiam com a miniaturização dos dispositivos de medida, apresentando diversas melhorias quando comparada as plataformas tradicionais, tais como menor consumo de reagentes e amostras, pequena geração de resíduos, análises mais rápidas e sistemas com maior portabilidade.^{2,3}

Os dispositivos miniaturizados permitem também a realização de análises em fluxo de uma maneira mais “verde”, ou seja, mais amigável ao meio ambiente, a qual é uma tendência mundial na Química Analítica, e tem por base o uso de metodologias com consumo reduzido de reagentes e/ou geração de resíduos tóxicos para a saúde humana e para o meio ambiente.⁴

No entanto, os elevados custos e a complexidade na fabricação dos dispositivos microfluídicos e dos seus acessórios, ainda impedem o seu emprego em larga escala. Tradicionalmente, a construção das plataformas microfluídicas se baseia nos materiais inorgânicos (silício e o vidro)^{5,6} ou nos diversos tipos de polímeros (elastômeros e termoplásticos),⁷⁻¹⁰ com o emprego de processos de microfabricação baseados em equipamentos altamente especializados para a construção dos canais microfluídicos com os mais variados perfis e de uma maneira exata e reprodutível.¹¹

Além disso, para a realização de ensaios em microfluxo, o transporte dos fluidos apresenta-se como um dos principais desafios, visto que são necessários o uso de microbombas ou de um sistema de bombeamento externo, os quais normalmente são difíceis de integrar aos canais microfluídicos dos dispositivos.^{12,13}

Desta forma, os fios de algodão surgiram como um material promissor para a construção de dispositivos microfluídicos simples e de baixo custo para a realização de microanálises em fluxo, devido a características como alta disponibilidade, construção de sistemas miniaturizados sem a necessidade de equipamentos de microfabricação e transporte de líquidos por capilaridade, dispensando a necessidade de integração de qualquer sistema de bombeamento mecânico.¹⁴

Os fios de algodão possuem também algumas importantes vantagens com relação ao papel (outro material celulósico empregado na fabricação de dispositivos microfluídicos de baixo custo), tal como maior flexibilidade e facilidade na construção de estruturas microfluídicas 3D, alta resistência mecânica mesmo quando molhados e formação de canais microfluídicos sem a necessidade de construção de barreiras hidrofóbicas.¹⁵

Além de materiais baratos e processos de fabricação simples, os dispositivos microfluídicos de baixo custo requerem um método de detecção com fácil adaptação as plataformas em miniatura. Entre as técnicas que normalmente são utilizadas em ensaios analíticos, as técnicas eletroquímicas apresentam algumas vantagens significativas para a sua utilização em dispositivos de microanálises, como alta sensibilidade (a qual não é afetada pela miniaturização das plataformas de medida), resposta rápida, fácil integração dos eletrodos aos canais microfluídicos, além de configurações eletrônicas simples, facilmente miniaturizadas e com um menor custo quando comparado com as outras técnicas de detecção.^{16,17}

Desta forma, o presente trabalho tem como proposta a construção e desenvolvimento de dispositivos microfluídicos eletroanalíticos simples e de baixo custo (μ TED) baseados na integração de fios de algodão hidrofílicos com as técnicas eletroquímicas. Estes sistemas foram utilizados nas análises em microfluxo sem o emprego de nenhum sistema de bombeamento mecânico, utilizando apenas bombeamento passivo das soluções pela ação capilar dos fios de algodão e auxiliada pela força gravitacional. Assim, de modo explorar a versatilidade e potencialidade dos dispositivos microfluídicos construídos com fios de algodão e avaliar o desempenho analítico dos mesmos, o trabalho foi dividido em cinco partes, cada qual possuindo objetivos distintos e se baseando em um μ TED com características diferentes:

Parte I - μ TED-1: avaliação da montagem do dispositivo microfluídico e detecção de compostos por amperometria de múltiplos pulsos (MPA);

Parte II - μ TED-2: otimização das características do dispositivo para a realização de análise por injeção em microfluxo (μ FIA) com alta frequência analítica e detecção por cronoamperometria;

Parte III - μ TED-3: integração ao dispositivo microfluídico de um biossensor amperométrico seletivo para glicose baseado em poli (O-Toluidina) (PTB) e glicose oxidase (GOx);

Parte IV - μ TED-4: realização de separações cromatográficas de compostos por troca iônica ao longo do canal microfluídico (fios de algodão) do dispositivo e detecção por cronoamperometria;

Parte V - μ TED-5: construção de um dispositivo microfluídico totalmente portátil em uma plataforma 3D versátil, com a integração dos canais microfluídicos baseados em fios de algodão a um sistema eletrônico miniaturizado de análise com alimentação elétrica por baterias e transmissão dos dados via USB ou *bluetooth*.

1.1 MICROFLUÍDICA

É definida como a ciência e tecnologia que tem por objetivo manipular pequenas quantidades de fluidos (entre μL e nL) no interior de canais com dimensões micrométricas, sendo que a ciência se ocupa em estudar o comportamento dos fluidos nos canais e a tecnologia se dedica a fabricação dos dispositivos ou sistemas microfluídicos, visando uma posterior aplicação.¹⁸

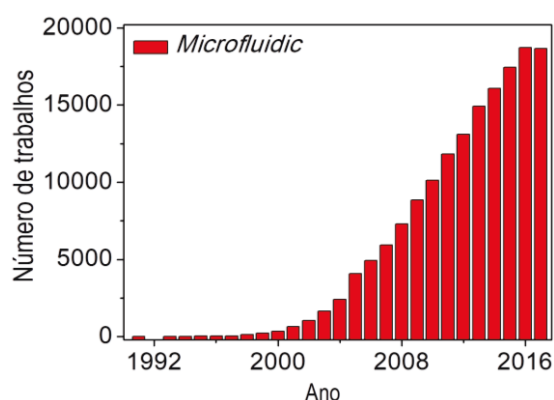
O desenvolvimento da microfluídica teve início no começo da década de 1950, com estudos realizados para a manipulação de pequenas quantidades de líquidos, na faixa de nanolitros a picolitros, fornecendo a base para a tecnologia atual de jato de tinta.¹⁹ Já o primeiro dispositivo analítico miniaturizado foi apresentado por Terry et al.²⁰ em 1979, o qual consistia de um sistema miniaturizado de cromatografia a gás construído em uma lâmina circular de silício com 5 cm de diâmetro, contendo uma válvula de injeção e uma coluna de separação de 1,5 m de comprimento, além de um detector de condutividade térmica fabricado em uma lâmina de silício mecanicamente prensada sobre a coluna de separação. Porém, mesmo apresentando um tamanho reduzido e separações rápidas, o dispositivo proposto por Terry et al. não gerou interesse da comunidade científica, provavelmente devido a falta de experiência tecnológica dos cientistas com dispositivos em miniatura. Assim, durante a década de 1980, os trabalhos se concentraram quase que exclusivamente no desenvolvimento de componentes em miniatura, tais como microbombas, microválvulas e sensores químicos.²¹

A retomada nas pesquisas com dispositivos analíticos em miniatura ocorreu no início da década de 1990, com o desenvolvimento do primeiro sistema microfluídico de cromatografia líquida de alta eficiência (*high performance liquid chromatography* - HPLC), fabricado em uma base de silício de 5 x 5 cm contendo uma coluna tubular aberta e um detector condutométrico, além de conexões externas para bombas e válvulas para aplicação de pressão.²² Ainda neste período, surgiu o conceito de micro sistemas para análises totais (*micro total analysis systems* - μ TAS) ou laboratório em um chip (*lab-on-a-chip* - LOC), os quais tinham como objetivo a integração de várias etapas analíticas (tais como introdução e pré-tratamento das amostras, reações químicas, separações analíticas e detecção) em um único dispositivo. Aliados ao desenvolvimento de diversos

componentes em miniatura, estes atraíram a atenção dos cientistas e impulsionaram as pesquisas com dispositivos microfluídicos.²³

Desta forma, ainda na década de 1990, foi observada a miniaturização de diversos sistemas de análise, tais como dispositivos responsáveis por μ FIA, eletroforese em microchips planares, sistemas de espectrometria de massas, além do início das pesquisas de amplificação de DNA, metabolismo celular e biomoléculas em geral em sistemas em miniatura.²⁴ A partir do ano de 2000, surgiram os primeiros equipamentos microfluídicos comerciais, permitindo o desenvolvimento de diversos dispositivos *point-of-care* (dispositivos de análise portáteis) para ensaios clínicos,²⁵ além de ser observado um crescimento constante até os dias atuais nos trabalhos que envolvem a microfluídica, como mostrado na Figura 1, a qual ilustra uma pesquisa feita no portal Scopus utilizando como palavra chave o termo “*microfluidic*”.

Figura 1. Evolução do número de trabalhos publicados ao longo dos anos com o termo *microfluidic*. Base de dados da busca: <https://www.scopus.com/>.



FONTE: O autor (2018)

1.2 DISPOSITIVOS MICROFLUÍDICOS

Os dispositivos microfluídicos possuem uma grande variedade de configurações que dependem do nível de integração dos componentes e das funções desejadas. As plataformas mais simples são caracterizadas por possuírem canais microfluídicos gravados ou moldados em uma base, que são conectados às regiões de entrada e saída dos líquidos (ou gases) e a outros componentes como reservatórios (poços) e câmaras.²⁶ Já os dispositivos microfluídicos mais complexos (chamados de μ TAS ou LOCs), os quais possuem o objetivo realizar todas as etapas que compõem uma análise em uma única plataforma de forma integrada e automatizada, incorporam aos dispositivos simples, diversos outros componentes em microescala, tais como reatores, bombas, misturadores, colunas cromatográficas e detectores.²⁵

1.2.1 Características

O alto grau de miniaturização dos dispositivos microfluídicos traz uma série de benefícios para a realização de ensaios analíticos. Uma das vantagens principais é a redução no volume necessário de amostras, solventes e reagentes para a realização das medidas. Comparado com um sistema convencional, um dispositivo microfluídico apresenta uma redução no volume de algumas ordens de grandeza (redução de mililitros para nanolitros), permitindo a realização de análises em volumes extremamente pequenos (medidas em uma única célula, ensaios forenses, etc), reduzindo drasticamente o consumo de reagentes caros e possibilitando o desenvolvimento de ensaios com produtos químicos perigosos, tais como traçadores radioativos.^{21,27}

Além disso, os dispositivos microfluídicos apresentam diversas outras vantagens, tais como alta portabilidade (com possibilidade de análises em campo), maior capacidade de paralelização, multiplexação e automação, menor consumo de espaço laboratorial, redução no risco de contaminação, rapidez nas análises, possibilidade de realizar separações com alta resolução, grande quantidade de informação (realização de diversos ensaios simultâneos), menor consumo de energia e menor custo por análise.^{25,28,29}

Um importante parâmetro que se beneficia da miniaturização das plataformas de análise é a razão entre o volume de solução presente nos canais microfluídicos e o volume que está em contato com as paredes dos canais (*surface-to-volume-ratio* ou SVR), visto que em dispositivos microfluídicos a SVR chega a ser dez mil vezes maior, com as interações soluto/parede dos canais tornando-se dominantes, possibilitando assim uma maior eficiência nas análises onde o contato com a superfície dos canais é importante, como em ensaios de imuno-afinidade, cromatografia ou detecção eletroquímica.³⁰

O comportamento dos fluidos em dispositivos miniaturizados de análise possuem algumas características interessantes, sendo diferente da hidrodinâmica em macro escala. Em micro escala, o fluxo é completamente laminar, pois a viscosidade dos fluidos torna-se dominante sobre as forças inerciais, sendo este fenômeno quantificado pelo número de Reynolds (Re), o qual é definido como:

$$Re = \frac{\rho v d}{\mu} \quad (1)$$

onde ρ é a densidade do fluido, v é a velocidade média do fluxo, d é o diâmetro do canal e μ é a viscosidade cinemática do fluido.³¹

Valores de Re acima de 2000 caracterizam o fluxo como turbulento e menores que 1000 indicam fluxos de natureza laminar, enquanto números de Re entre 1000 e

2000 descrevem fluxos transitórios (alternados entre laminar e turbulento). Em dispositivos microfluídicos, o número de Reynolds apresenta-se muito baixo, com valores menores que 1 (geralmente entre 10^{-3} e 10^{-5}), indicando um fluxo completamente laminar. Ele possui como principal vantagem, um controle preciso das variáveis do fluido, tais como velocidade, tensão de cisalhamento, temperatura e concentração de produtos químicos, o que é difícil de conseguir em dispositivos em macro escala.^{32,33}

Outra característica interessante apresentada em dispositivos microfluídicos diz respeito ao transporte de massa do soluto, o qual é predominantemente feito por difusão, como descrito pelo número de Péclet (Pe), que é calculado de acordo com a seguinte equação:

$$Pe = \frac{U_a H}{D} \quad (2)$$

onde U_a é a velocidade média do fluxo, H é o comprimento característico do sistema perpendicular à direção do fluxo e D é o coeficiente de difusão da partícula ou molécula de interesse.³⁴ A transição de um transporte de massa por difusão para um transporte de massa por advecção ocorre em um valor de Pe de 1. Os dispositivos microfluídicos apresentam valores de Pe muito baixos, com a difusão tornando o modo dominante no transporte de massa, característica que é utilizada tanto para a misturar de forma eficaz líquidos miscíveis, quanto para separar pequenas moléculas de objetos maiores (tal como esferas ou células) nos chamados filtros H, ou ainda para melhorar a eficiência das separações cromatográficas realizadas em sistemas em miniatura, devido ao aumento do transporte de massa difusivo do analito da fase líquida para a fase sólida estacionária.^{30,35}

1.2.2 Funções e aplicações

Dependendo das necessidades da análise a ser feita, os dispositivos microfluídicos devem ser capazes de desempenhar algumas funções ou operações básicas, das quais as principais incluem o preparo de amostra, a separação de compostos, o transporte dos líquidos e a detecção das espécies de interesse. As funções requeridas e o objetivo geral da análise irão definir a configuração, os componentes e a complexidade do dispositivo microfluídico a ser utilizado.³⁶

Devido a características das amostras como volume limitado, matriz contendo espécies potencialmente interferentes e baixas concentrações do analito, é fundamental a aplicação das etapas de preparo da amostra e/ou separação dos compostos.³⁷ Com relação ao preparo das amostras, vários processos já estão integrados aos dispositivos microfluídicos. Os mais importantes incluem os processos de extração e purificação

(principalmente com o uso de extração em fase sólida, empregando a extração em fase reversa ou extração por afinidade alvo-receptor),³⁸⁻⁴⁰ pré-concentração utilizando características de analito como carga, afinidade, mobilidade e tamanho (através do emprego de gradientes de temperatura, métodos de varredura que utilizam uma fase pseudo-estacionária, métodos de exclusão ou através das técnicas de eletroforese),⁴¹ e ainda processos de marcação (utilizando os métodos de derivatização).⁴²

Para a separação de compostos, as principais técnicas integradas nos dispositivos microfluídicos incluem a cromatografia, a eletroforese e o fracionamento. Inicialmente, os sistemas eletroforéticos miniaturizados foram os que ganharam maior atenção, devido a capacidade de realizar separações de uma ampla gama de analitos, com resposta rápida, boa resolução e sem a necessidade de partes móveis.⁴³ Os dispositivos eletroforéticos em miniatura permitem a fabricação de diversos canais microfluídicos integrados em uma única plataforma, diferentemente dos instrumentos convencionais, os quais consistem de um ou mais canais capilares discretos.⁴⁴ As formas de eletroforese mais empregadas em sistemas miniaturizados incluem a eletroforese capilar,⁴⁵ a eletroforese em gel⁴⁶ e a focalização isoeletrica.⁴⁷

A cromatografia líquida também foi integrada nos dispositivos microfluídicos, alcançando importantes progressos ao longo do tempo, com a possibilidade de uma ampla variedade de modos de separação através do emprego de diferentes suportes, sendo que os mais utilizados em microfluídica incluem as colunas empacotadas com partículas, colunas compostas por arranjos de pilares e colunas monolíticas.⁴⁸⁻⁵⁰ Métodos híbridos entre cromatografia e eletroforese também foram integrados em plataformas microfluídicas, com destaque para a eletrocromatografia capilar⁵¹ e a cromatografia eletrocinética micelar.⁵²

Por fim, os métodos de separação baseados em fracionamento têm sido empregados em dispositivos microfluídicos, com a fracionalização isoeletrica digital (a qual emprega membranas pH-específicas separadas para concentrar os analitos com base em seus pontos isoeletricos)⁵³ e a fracionalização fluxo-campo (com a separação das partículas através de um campo perpendicular à direção do fluxo)⁵⁴ sendo os principais exemplos.

Para a manipulação dos fluidos nos dispositivos microfluídicos, três componentes são normalmente empregados: microbombas, microválvulas e misturadores, os quais são classificados em sistemas ativos ou passivos, de acordo com a necessidade ou não do emprego de energia ou equipamentos externos, respectivamente.⁵⁵ As microbombas têm a função de gerar e facilitar o fluxo das soluções ao longo dos dispositivos microfluídicos, sendo que a integração destes componentes permite a redução e em alguns casos até a eliminação dos equipamentos externos de bombeamento, além de possibilitar a

diminuição no volume morto das soluções presentes na interface com os canais microfluídicos.⁵⁶ As principais microbombas empregadas em dispositivos microfluídicos incluem os sistemas passivos baseados na ação capilar,^{57,58} tensão superficial do fluido,⁵⁹ força gravitacional⁶⁰ e fluxo desgaseificado com poli(dimetilsiloxano) (PDMS).⁶¹ Os sistemas ativos incluem as microbombas eletrosmótica,⁶² pneumática-peristáltica,⁶³ eletrohidrodinâmica,⁶⁴ acústica⁶⁵ e magnetohidrodinâmica.⁶⁶

Já as microválvulas têm a importante função de controlar o movimento e a direção do fluxo das soluções, sendo o PDMS o material mais utilizado para a fabricação destes componentes, os quais também podem ser construídos com outros materiais termoplásticos ou compostos híbridos formados pela combinação de vidro e as diferentes formas de polímeros.⁶⁷ As principais microválvulas utilizadas em dispositivos microfluídicos incluem as válvulas passivas de retenção⁶⁸ e expansão capilar⁶⁹ e as válvulas ativas pneumáticas,⁷⁰ de mudança de fase⁷¹ e magnética.⁷²

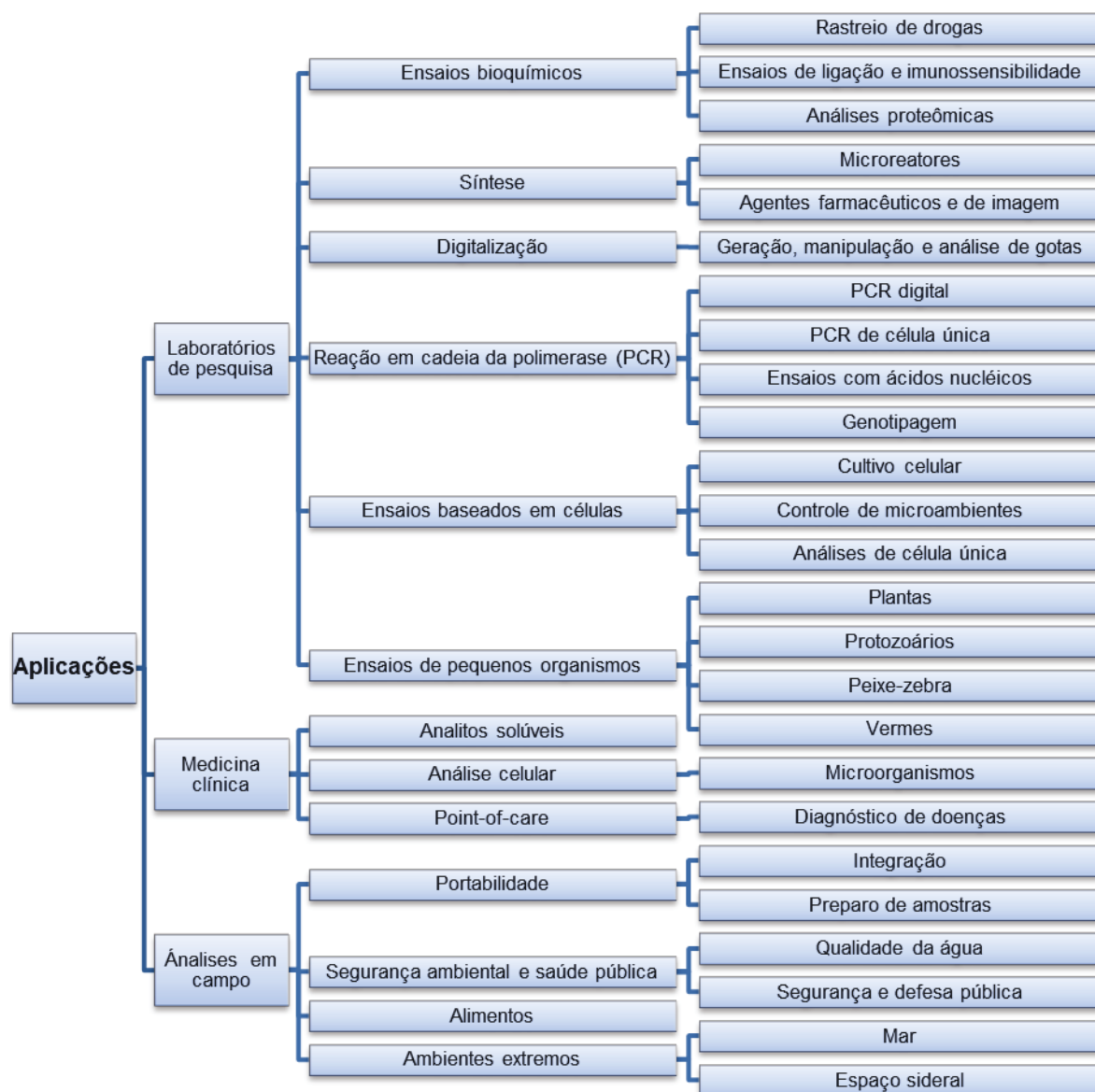
Para a mistura de soluções e analitos nos dispositivos microfluídicos, são empregados misturadores, os quais baseiam-se no processo de difusão das espécies, visto que o tamanho reduzido dos canais e o fluxo laminar dificultam a utilização dos mecanismos convencionais de mistura. Diversas configurações foram desenvolvidas com o objetivo de combinar múltiplas amostras de forma rápida e simples, sendo que os principais misturadores passivos são aqueles em forma de T ou Y, e os que têm como mecanismo de atuação a laminação e advecção caótica,⁷³ além dos misturadores ativos baseados na eletrocinética, acústica ou magnetohidrodinâmica.⁷⁴

Por fim, outra função necessária nos dispositivos microfluídicos diz respeito a detecção das espécies de interesse, sendo um dos processos mais importantes e desafiadores, visto o alto grau de miniaturização das plataformas de microanálise. As características que um detector precisa ter em um sistema microfluídico incluem alta sensibilidade e boa razão sinal/ruído, capacidade de detecção em volumes mínimos (entre μL e fL) e tempo de resposta rápida.³⁰ Assim, as técnicas que geralmente são incorporadas aos dispositivos microfluídicos e que apresentam bom desempenho incluem a fluorescência induzida por laser,⁷⁵ quimiluminescência,⁷⁶ eletroquimiluminescência,⁷⁷ detecção eletroquímica (condutometria, potenciometria e amperometria),⁷⁸⁻⁸⁰ espectrometria de massa (ionização por electrospray - ESI e ionização e dessorção a laser assistida por matriz - MALDI),^{81,82} espectroscopia Raman amplificada por superfície (SERS)⁸³ e detecção através de biossensores (ressonância de plasma de superfície, microbalança de cristal de quartzo, amperometria e biossensor térmico).⁸⁴⁻⁸⁷

Desta forma, com todas as funções apresentadas pelos dispositivos microfluídicos, estas plataformas possuem uma ampla diversidade de aplicações, as quais abrangem as áreas da ciência básica (laboratórios de pesquisa), medicina clínica e

trabalhos em campo (Figura 2), com destaque para as pesquisas em uma única célula, síntese e rastreo de drogas, genética, proteômica, saúde e segurança ambiental e controle de qualidade da água e alimentos.⁸⁸⁻⁹¹ A enorme variedade de aplicações que os dispositivos microfluídicos apresentam se deve também as melhorias que essas plataformas oferecem aos métodos de análise existentes ou a possibilidade de novas estratégias de ensaios, sendo que ambos os métodos (convencionais e novos) se beneficiam das inúmeras vantagens oferecidas pelos dispositivos microfluídicos, tais como aumento no número de análises, alta integração, grande miniaturização dos sistemas, baixo volume de amostras e reagentes, dentre muitas outras.⁹²

Figura 2. Esquema geral das áreas de aplicação dos dispositivos microfluídicos.



FONTE: O autor (2018). Informações retiradas das referências 88-91.

1.2.3 Materiais

Em microescala, as propriedades superficiais dos materiais utilizados como base para a construção dos canais microfluídicos são muito amplificadas, podendo conferir funções únicas aos dispositivos ou levar a problemas que não seriam encontrados em macroescala (em sistemas de análise convencional).^{32,34,93} Assim, para um bom desempenho do dispositivo microfluídico a ser construído, os principais fatores a serem considerados na escolha do material incluem a função requerida, grau de integração e aplicação, além de propriedades como flexibilidade, permeabilidade do ar, condutividade elétrica, adsorção não específica, compatibilidade celular, transparência óptica e compatibilidade com o solvente.⁸⁸ Desta forma, os materiais mais utilizados na construção de dispositivos microfluídicos são divididos em três classes: materiais inorgânicos, polímeros e papel.

Os materiais inorgânicos (silício e vidro) foram os primeiros compostos utilizados na fabricação de dispositivos microfluídicos, através do emprego das técnicas de fotolitografia, deposição de metais e gravuras via úmida ou seca.⁹⁴ Devido a resistência aos solventes orgânicos, facilidade no depósito de metais, alta condutividade térmica e mobilidade eletrosmótica estável, os dispositivos microfluídicos baseados em silício e vidro são utilizados principalmente em eletroforese capilar,⁹⁵ em micro-reações,⁹⁶ formação de gotículas⁹⁷ e na extração com solventes orgânicos.⁹⁸ Porém, estes materiais possuem algumas limitações críticas que restringem a sua ampla aplicação na microfluidica, tais como o elevado custo de fabricação dos dispositivos, necessidade de utilização de produtos químicos perigosos (como o ácido fluorídrico), dificuldade na junção das partes dos dispositivos (necessidade de altas temperaturas e altas pressões), impossibilidade na permeação de gases e dificuldade na integração e/ou construção de microválvulas e microbombas.⁹⁹

Como alternativa para o silício e o vidro, os diversos tipos de polímeros tornaram-se os materiais mais utilizados para a construção de dispositivos microfluídicos, devido a características como custo de fabricação menor quando comparado com os materiais inorgânicos, possibilidade de produção em massa e facilidade na alteração de sua formulação para a realização de modificações químicas superficiais.¹⁰⁰ Uma grande variedade de processos de fabricação são empregados para a construção de dispositivos microfluídicos poliméricos, os quais incluem ablação a laser, gravura por plasma, moldagem por injeção, termoformagem, fundição, gravação a quente, estereolitografia, usinagem de precisão, entre outros.^{101,102}

De acordo com as propriedades físicas, os polímeros utilizados em dispositivos microfluídicos podem ser classificados em elastômeros e termoplásticos. Os elastômeros

deformam facilmente quando uma força externa é exercida, porém, voltam à forma original quando a mesma é retirada. O principal exemplo de elastômero é o PDMS, que é o material mais utilizado em microfluídica, possuindo como principais características a possibilidade da construção de canais com resolução nanométrica a partir de modelos fotossensíveis, montagem de estruturas microfluídicas multicamadas pelo simples empacotamento das camadas individuais do polímero, além da fácil integração de outros componentes, tais como microbombas e microválvulas.¹⁰³⁻¹⁰⁵

A outra classe de polímeros é composta pelos termoplásticos, os quais possuem a propriedade de alterar seu formato quando aquecidos, característica importante durante os processos de moldagem dos dispositivos microfluídicos.¹⁰⁶ Os principais termoplásticos utilizados em microfluídica são o polimetilmetacrilato (PMMA), polycarbonato (PC), poliestireno (PS), polietileno tereftalato (PET) e o cloreto de polivinila (PVC),^{107,108} os quais apresentam boa resistência a álcoois, mas são incompatíveis com outros solventes orgânicos, tais como cetonas e hidrocarbonetos. Outra característica desta classe de polímeros diz respeito a sua rigidez, o que dificulta a fabricação de componentes integrados aos dispositivos microfluídicos, tais como diafragmas e microválvulas.¹⁰⁹

Assim, desde 2007, quando Martinez et al.¹¹⁰ apresentou o primeiro dispositivo microfluídico construído em papel com a formação de canais hidrofílicos definidos por barreiras hidrofóbicas, a utilização deste material para a realização de microanálises apresentou um crescimento exponencial, devido a simplificação, aos menores custos de fabricação e a maior portabilidade das plataformas construídas com esse material.¹¹¹ Além disso, o papel possui diversas outras características favoráveis a sua utilização em dispositivos microfluídicos: material barato e disponível em grandes quantidades; canais microfluídicos altamente hidrofílicos, o que faz com que o transporte dos líquidos seja feito pela ação capilar e dispense o uso de outros sistemas de bombeamento; alta razão superfície-volume dos seus canais microfluídicos; formação de dispositivos multicamadas através do empilhamento de camadas individuais de papel; filtragem de partículas da amostra; fácil modificação através da mudança na composição do papel ou pela incorporação de espécies químicas ou bioquímicas em sua superfície; e cor branca, o que facilita as análises através dos métodos colorimétricos.¹¹²⁻¹¹⁴

A fabricação dos dispositivos microfluídicos em papel baseia-se normalmente na construção de barreiras hidrofóbicas, a qual pode ser feita por diversas técnicas, tais como impressão com cera, jato de tinta ou flexográfica, fotolitografia, tratamento com plasma ou laser, gravura via úmida, plotagem, deposição química, entre outros.¹¹⁵⁻¹¹⁷ Como forma de detecção, as análises realizadas nos sistemas microfluídicos em papel

empregam principalmente as técnicas colorimétricas, eletroquímicas, quimioluminescência, eletroquimioluminescência e fluorescência.^{118,119}

Entretanto, embora o papel seja um material versátil e acessível para a criação de dispositivos microfluídicos, ele apresenta algumas limitações importantes. Uma delas diz respeito a grande diminuição na sua resistência mecânica quando soluções são introduzidas nos canais ou quando expostos a alterações cíclicas de umidade.¹²⁰ Outra limitação observada nas microanálises em papel refere-se à necessidade de construção das barreiras hidrofóbicas para a criação dos canais microfluídicos, visto que em algumas situações esta etapa torna-se complicada e demorada. Além disso, muitos agentes hidrofobizantes não formam uma barreira forte o suficiente para repelir amostras com baixa tensão superficial, causando o vazamento para fora dos canais.¹²¹ Desta forma, outros materiais celulósicos começaram a ser empregados em dispositivos microfluídicos, com destaque para os fios de algodão, os quais possuem características que permitem superar as limitações apresentadas pelas plataformas em papel.

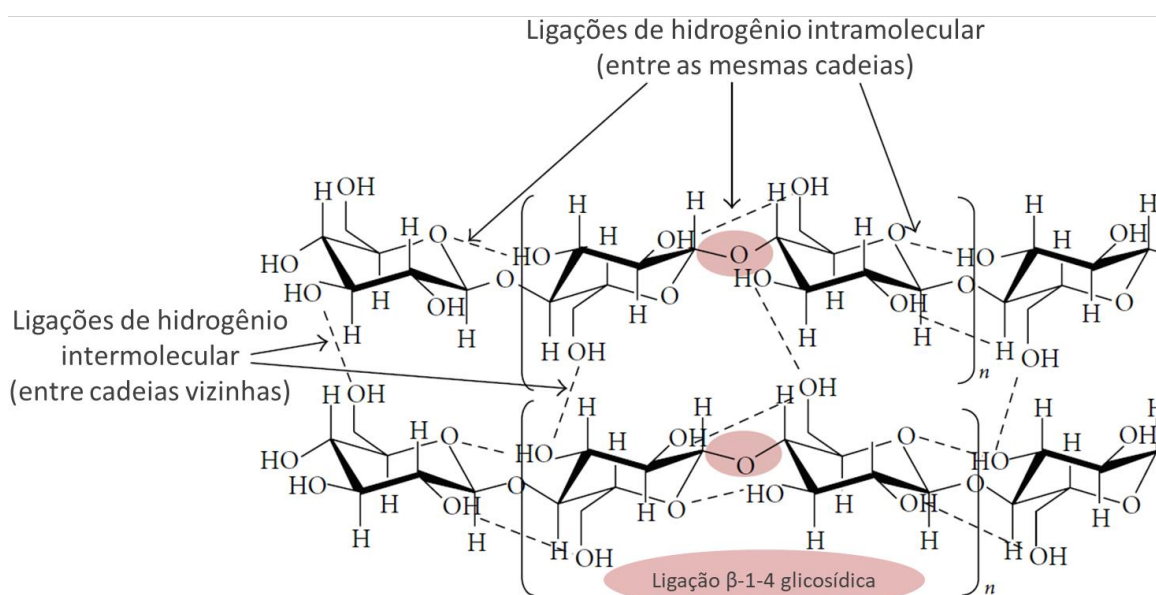
1.3 FIOS DE ALGODÃO

O algodão é a fibra têxtil natural mais importante do mundo, sendo utilizada em uma infinidade de produtos, como na fabricação de roupas, telas e materiais industriais. Após o processo de descaroçamento e limpeza mecânica, a fibra de algodão crua é composta por aproximadamente 95% de celulose, com os 5% restantes sendo constituídos por compostos não celulósicos, principalmente proteínas, aminoácidos, outros compostos contendo nitrogênio, cera, substâncias pécticas, ácidos orgânicos, açúcares, sais inorgânicos e pigmentos.¹²² Algumas variações nos constituintes das fibras podem ocorrer devido a alterações ambientais, maturidade da fibra e tipo do algodão produzido. Para a remoção dos compostos não celulósicos (indesejáveis na produção dos fios) são aplicados diferentes tratamentos, os quais incluem a utilização de solução aquecida de hidróxido de sódio (mercerização),¹²³ enzimas,^{124,125} plasma de oxigênio,¹²⁶ solução de Na_2CO_3 ¹²⁷ ou solução de polisorbato e albumina de soro bovino.¹²⁸ Após a aplicação dos tratamentos, o teor de celulose na fibra de algodão sobe para níveis superiores a 99%.

A celulose é um polímero natural linear formado por moléculas de β -glicose através de ligações β -1-4 glicosídicas (Figura 3), sendo insolúvel em água e soluções diluídas de ácidos ou bases em temperatura ambiente.¹²⁹ Os monômeros de glicose estão ligados entre si através da eliminação de uma molécula de água entre o grupo hidroxila ligado ao átomo de carbono 1 de uma molécula e o átomo de carbono 4 de outra molécula de glicose. A estrutura da celulose é estabilizada por ligações de hidrogênio

intermoleculares e intramoleculares, permitindo com que os monômeros de glicose permaneçam ligados lado a lado, formando cadeias de polímeros não ramificadas de grande comprimento, dando origem a fibras com elevada resistência mecânica e força de tensão.^{130,131} Nas fibras de algodão não degradadas, o comprimento da cadeia molecular (grau de polimerização) pode ser superior a 20000 unidades monoméricas, o que corresponde a um peso molecular de 3240 kilodalton (kDa).¹²²

Figura 3. Estrutura química das cadeias de celulose.

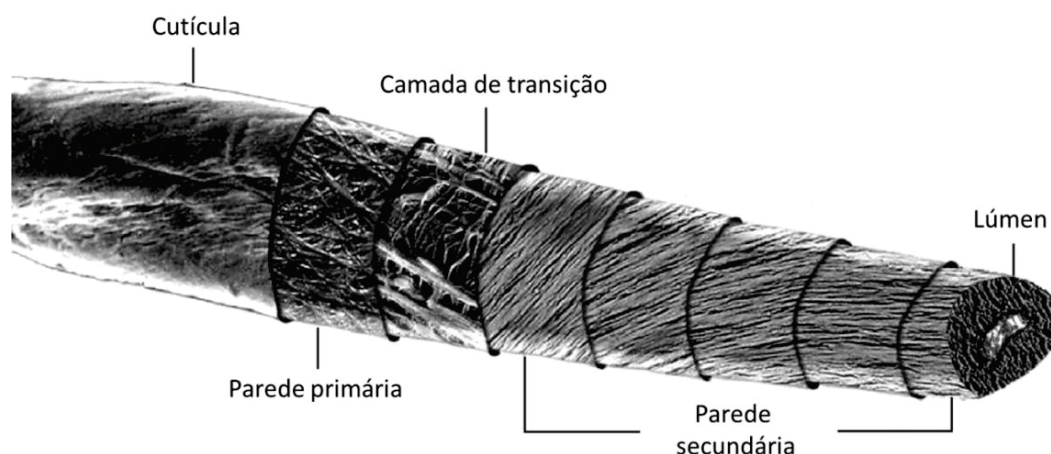


FONTE: Adaptado da referência 129.

Cada fibra de algodão é composta por 5 camadas, como mostrada na Figura 4. A cutícula, que é a camada mais externa, contém cera, pectina e proteínas, e tem a função de formar um revestimento resistente à água.¹³² A cutícula é removida da fibra durante os tratamentos aplicados para a retirada dos compostos não celulósicos. A parede primária é constituída por uma rede de nanofibrilas de celulose, formando uma camada de capilares estreitos, contínuos e bem organizados. A camada de transição (também conhecida como camada S1), possui uma estrutura diferente da camada primária, consistindo de fibrilas alinhadas em ângulos de 40 a 70 graus em relação ao eixo da fibra, em um padrão de rede aberta.¹³³ A parede secundária (também conhecida como camada S2), consiste na porção principal da fibra de algodão, sendo formada por camadas concêntricas de celulose, composta de fibrilas depositadas em ângulos de 70 a 80 graus em relação ao eixo da fibra, formando pequenos capilares, assim como a parede primária.¹²² Por fim, o lúmen é um canal que está localizado na parte mais interna da fibra e que durante o período de crescimento da planta fica preenchido com

protoplastos vivos. Depois do amadurecimento da fibra, o conteúdo interno seca e o lúmen colapsa, deixando um espaço vazio central.¹³⁴

Figura 4. Camadas que compõe uma fibra de algodão, com montagem das estruturas feitas a partir de micrografias de microscopia eletrônica de varredura.



FONTE: Adaptado da referência 122.

Os fios de algodão são compostos por centenas de fibras arranjadas em paralelo, gerando assim uma grande quantidade de poros neste material,¹³⁵ e consequentemente, criando um efeito capilar no fio devido a polaridade das fibras, a qual é proveniente dos grupamentos hidroxila (OH) da celulose. Essa característica permite o transporte de líquidos ao longo dos fios de algodão, o qual é facilitado pela forma organizada (em paralelo) como as fibras estão dispostas, fazendo com que as soluções enfrentem menos obstáculos e sejam transportadas em apenas uma direção, seguindo o sentido das fibras.¹³⁶

Tal característica se diferencia do papel, onde os líquidos penetram também no sentido radial, devido ao menor comprimento das fibras e ao modo não organizado de como elas estão dispostas, além da estrutura aleatória dos poros formados, gerando a necessidade de barreiras hidrofóbicas para direcionar o sentido do fluxo dos líquidos.¹³⁷ Assim, com um transporte mais eficiente e organizado, os fios de algodão apresentam-se como um material promissor para a construção de dispositivos microfluídicos simples e de baixo custo, com características superiores aos sistemas baseados em papel.

1.3.1 Dispositivos microfluídicos baseados em fios de algodão

O emprego dos fios de algodão para a construção de dispositivos miniaturizados é um conceito relativamente novo na microfluídica, com os primeiros trabalhos sendo

reportados em 2010 por Li e Reches,^{126,138} os quais descreveram dispositivos construídos com fios de algodão para detecção colorimétrica de biomarcadores em amostras de urina sintética e plasma artificial. A partir de então, o emprego dos fios de algodão para a fabricação de dispositivos microfluídicos vem atraindo um interesse crescente ao longo dos anos, devido a algumas características superiores quando comparado com os sistemas baseados em papel, tal como alta resistência mecânica mesmo depois de umedecido, grande flexibilidade, possibilitando a criação de circuitos microfluídicos tridimensionais (3D), fácil integração com roupas, tecidos em geral e até no corpo das pessoas, formação de canais microfluídicos sem a necessidade da construção de barreiras hidrofóbicas e um melhor confinamento dos fluidos no canal microfluídico (fios), reduzindo a perda de líquidos devido a ausência de transporte lateral dos fluidos, possibilitando assim a utilização de volumes menores de reagentes, solventes e amostras para a realização dos ensaios.^{121,139,140} Além disso, canais microfluídicos contendo fios de algodão com diferentes tratamentos ou fios de outros materiais (tais como poliéster, náilon, lã, seda natural, cânhamo, raio) podem ser facilmente construídos, de modo a criar funções específicas no dispositivo.¹⁴¹

Os fios de algodão possuem diversas outras características que os tornam promissores para a fabricação de dispositivos microfluídicos, as quais incluem o baixo custo do material, grande disponibilidade em todo o mundo, transporte dos líquidos por capilaridade ao longo dos fios, os quais atuam como uma bomba passiva e eliminam a necessidade da utilização de qualquer outro sistema de bombeamento, facilidade e versatilidade na funcionalização com espécies químicas ou biocomponentes, simplicidade na criação das zonas de detecção, confecção dos fios na cor branca (característica desejável em ensaios colorimétricos), além de ser um material biodegradável com fácil descarte e apresentar a possibilidade de queima em caso de contaminação com fluidos biológicos.¹⁴²⁻¹⁴⁴

Para a fabricação dos dispositivos microfluídicos, os fios de algodão normalmente passam por um tratamento prévio para melhorar o transporte de líquidos (através da remoção dos compostos não celulósicos) ou para a incorporação de determinados grupos funcionais ou elementos de reconhecimento biológico (tal como enzimas, anticorpos, ácidos nucleicos).^{135,145-149} A montagem do canal microfluídico se baseia na adição dos fios de algodão já tratados a base do dispositivo, com a simples deposição, fixação nas extremidades dos fios, através de nós ou ainda pela incorporação direta em materiais hidrofóbicos tal como tecidos, filmes poliméricos ou fitas adesivas.¹⁴¹

As propriedades relacionadas ao transporte dos líquidos (tal como vazão e sentido do fluxo) ao longo dos dispositivos construídos com fios de algodão podem ser ajustadas através de características como número de fibras, diâmetro e comprimento dos fios,¹³⁹

assim como a forma e a orientação como são interligados ou montados sobre a base do dispositivo.^{150,151} Também é possível introduzir (ou realizar) funções específicas (como misturas, separações e rede de distribuição de líquidos) nos canais microfluídicos baseados em fios, como válvulas de fluxo on/off empregando cola adesiva,¹⁵² misturas e distribuição de soluções na forma de rede de canais obtidas com a junção de fios em diferentes ângulos e com nós de vários tipos,¹⁵³ formação de um gradiente de concentração em uma rede de diluição e recombinação em série (com os fios unidos com nós) auxiliado por ondas acústicas de alta frequência¹⁵⁴ e separação de compostos através da utilização de fios contendo espécies químicas¹⁵⁵ ou biológicas.¹⁵⁶

As aplicações propostas para os dispositivos microfluídicos construídos com fios de algodão se concentram principalmente em análises voltadas para a área biomédica, sendo a detecção colorimétrica a mais utilizada, a qual foi empregada para a determinação dos grupos sanguíneos ABO e Rh, albumina, glicose e das proteínas C-reativa, osteopontina e leptina em amostras de sangue humano.^{145,156,157} Ensaios colorimétricos também foram realizados para a determinação de albumina, proteína, nitrito, cetona, glicose e fosfatase alcalina em amostras de urina sintética e plasma artificial,^{126,138} pH no suor humano,¹²⁷ 158 pH no suor humano,¹⁵⁹ fenóis totais e capacidade antioxidante em amostras de chá verde e concentração de potássio em água mineral.^{148,160} Por fim, dispositivos microfluídicos construídos com fios de algodão foram empregados na determinação de glicose e ácido úrico em amostras de sangue e urina por quimioluminescência,^{121,139} lactato por amperometria,¹⁶¹ além de Cu(II) e Zn(II) por espectrometria de lente térmica (TLS).¹⁵¹

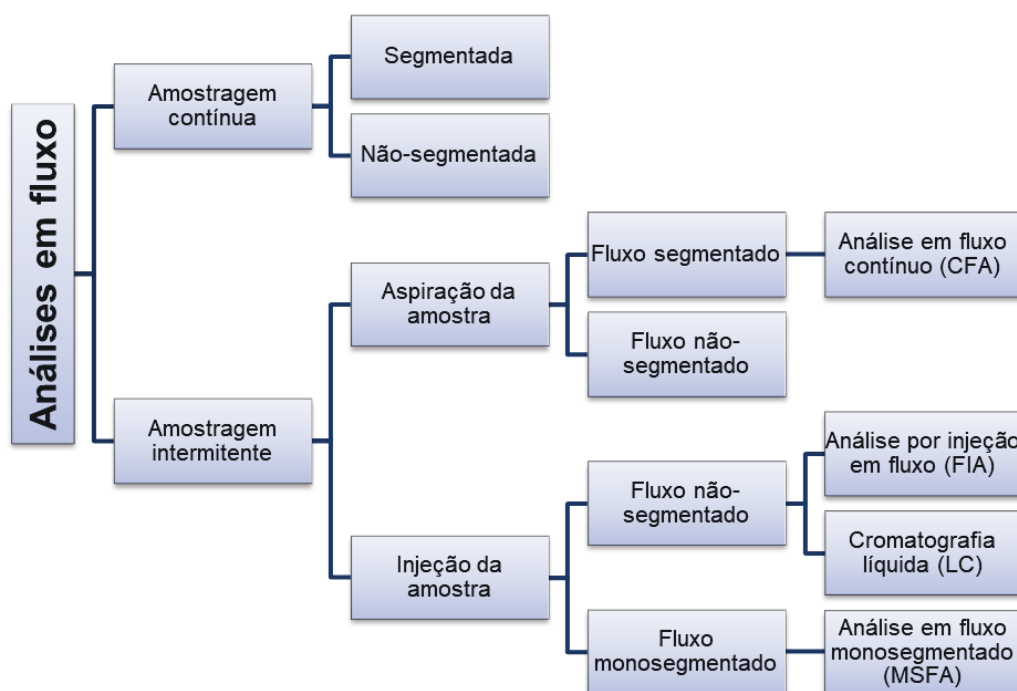
Além das aplicações citadas no parágrafo anterior, os dispositivos microfluídicos construídos com fios de algodão apresentam ainda um grande potencial analítico a ser explorado, como por exemplo, para a realização de análises em microfluxo, a qual pode ser facilmente realizada devido a características dos fios de algodão como flexibilidade, alto caráter hidrofílico e transporte contínuo por capilaridade.

1.4 ANÁLISES EM FLUXO MINIATURIZADAS

O termo análise em fluxo é uma definição genérica que abrange todas as técnicas analíticas baseadas na introdução, processamento e detecção de amostras líquidas em meios fluidos. O processamento da amostra envolve o transporte, a separação, as reações químicas e o tratamento térmico realizados em condições de difusão e/ou de dispersão por convecção, com a amostra sendo transportada por um fluxo de uma solução desde o local da inserção, passando pelas regiões específicas do dispositivo (como o local de detecção) e chegando até a região de descarte ou retornando para a

área de amostragem, em caso de recirculação.^{162,163} As técnicas de análise em fluxo são classificadas de acordo com (i) o método de introdução da amostra, que pode ser contínuo ou intermitente (por aspiração ou injeção) e (ii) o caráter básico do fluxo, podendo ser segmentado, não-segmentado ou monosegmentado,¹⁶⁴ como mostrado na Figura 5.

Figura 5. Esquema de classificação dos métodos de análise em fluxo.



FONTE: Adaptado da referência 164.

As análises em fluxo apresentaram uma grande evolução ao longo dos anos, com a adaptação dos métodos clássicos em plataformas miniaturizadas e a incorporação de conceitos mais racionais e ecológicos em seus procedimentos, em grande parte incentivada pelos princípios da química analítica verde (*Green Analytical Chemistry - GAC*), a qual é uma forte tendência dentro da química analítica atual. A GAC tem como objetivo tornar as práticas de laboratório mais amigáveis com o meio ambiente, através do desenvolvimento de instrumentação e metodologias para melhorar a qualidade das análises químicas, reduzir o impacto negativo dos ensaios sobre o meio ambiente e permitir a implementação dos princípios de desenvolvimento sustentável nos laboratórios analíticos.^{165,166}

Desta forma, para direcionar as ações relacionadas a GAC, foram propostos 12 princípios, sendo eles:¹⁶⁷

1. Aplicação de técnicas analíticas diretas de modo a evitar o tratamento das amostras;
2. Uso de quantidades e número mínimo de amostras;
3. Realização de medidas *in situ*;
4. Integração de operações e processos analíticos para economizar energia e reduzir o uso de reagentes;
5. Escolha de métodos automatizados e miniaturizados;
6. Evitar a derivatização;
7. Geração de uma menor quantidade de resíduos analíticos e gerenciamento dos resíduos que forem produzidos;
8. Seleção de métodos multianálitos ou multiparâmetros ao invés de métodos que determinem um analito por vez;
9. Redução no uso de energia;
10. Emprego de reagentes obtidos por fontes renováveis;
11. Eliminação ou substituição de reagentes tóxicos;
12. Ampliação da segurança do operador.

Assim, com a troca de informações e experiências entre os conceitos da GAC e da miniaturização dos sistemas de análise em fluxo, ambas as áreas se beneficiaram e acabaram se desenvolvendo. Deste modo, o desenvolvimento dos dispositivos de análise em microfluxo tem como foco (e objetivo) a realização de pesquisas relacionadas a manipulação e tratamento de pequenas quantidades de amostras, o desenvolvimento de reações (bio)químicas em ambientes miniaturizados, além da separação e detecção dos compostos para o desenvolvimento de processos analíticos totalmente integrados em sistemas miniaturizados automatizados.¹⁶⁸ Com isso, possibilitando a construção de dispositivos de análise em fluxo para aplicações diretas por usuários finais (população em geral) e não apenas em laboratórios especializados, satisfazendo a necessidade crescente de se obter informações analíticas contínuas e em tempo real.¹⁶⁹

Como principais características, os sistemas de análise em microfluxo apresentam a integração, em um único dispositivo, das unidades de propulsão, mistura e detecção, explorando os princípios da microfluídica, porém, mantendo as características analíticas dos sistemas convencionais, de modo a não prejudicar as determinações dos analitos.¹⁷⁰ Em muitos casos, foi obtida inclusive uma melhora na performance, com um aumento da sensibilidade, possibilidade da realização de medidas sem a necessidade da etapa de pré-concentração dos analitos e redução no tempo total da análise. Além disso, os sistemas em microfluxo apresentam outras características importantes para o desenvolvimento de processos analíticos mais ecológicos e baratos: vazões na ordem de nL até μL , o que reduz drasticamente a quantidade necessária de reagentes, solventes,

amostras e consequentemente no volume de resíduos gerados; processos analíticos com maior rendimento e precisão; dispositivos com configurações simples e com tamanho reduzido, alta portabilidade e possibilidade no monitoramento *in situ* e contínuo; sistemas fechados, reduzindo o risco de decomposição, contaminação ou perda dos analitos, além de minimização da exposição do analista a produtos químicos tóxicos.¹⁷¹

Dentre todas as técnicas de análises em fluxo, a análise por injeção em fluxo (FIA) e a cromatografia líquida (LC) estão entre as mais utilizadas em dispositivos miniaturizados, as quais possuem todas as vantagens citadas no parágrafo anterior. A FIA ou μ FIA (análise por injeção em microfluxo, no caso dos dispositivos miniaturizados) se baseia na injeção do analito e/ou reagente líquido em um fluxo contínuo (não-segmentado), inerte ou reativo (normalmente denominada de solução transportadora), com a detecção do analito, reagente ou o produto de uma reação química em uma determinada região do dispositivo.¹⁷² A injeção da amostra no sistema forma uma zona bem definida do analito ou reagente dentro do canal do dispositivo, ocorrendo a dispersão desta zona até a região de detecção. O perfil de concentração dos analitos que chegam ao local de detecção é influenciado pela forma como a amostra foi injetada, pelos parâmetros relacionados ao fluxo e pela geometria do canal situado entre o ponto de injeção da amostra e o local de detecção. Um transiente (simétrico ou assimétrico) na forma de pico (ao invés de um platô estável) é obtido como sinal de detecção, com a dispersão da amostra determinando a frequência analítica (número de análise por unidade de tempo) do método.¹⁷³

Assim, a μ FIA é uma técnica que apresenta todas as vantagens relacionadas a miniaturização das análises em fluxo e dos conceitos da GAC incorporados a esses dispositivos, como relatados anteriormente. Desta forma, os sistemas μ FIA possuem uma grande variedade de aplicações, dentre os quais incluem a detecção de nitrato, fosfato e amônia por espectrofotometria,¹⁷⁴⁻¹⁷⁶ Fe (II) por microscopia de lente térmica,¹⁷⁷ determinação de glicose por quimioluminescência,¹⁷⁸ atrazina em frutas através de imunensaio enzimático,¹⁷⁹ e o receptor de estrogênio alfa por amperometria.¹⁸⁰

Já na LC, os sistemas de análise são projetados para a separação dos componentes de uma determinada amostra, a qual é injetada em uma fase móvel líquida que passa através de uma coluna contendo uma fase estacionária, com os componentes da amostra sendo separados com base nas diferenças de distribuição das espécies entre as fases móvel e estacionária.¹⁸¹ As análises de LC são realizadas sob condições hidrodinâmicas controladas, com a dispersão do analito ocorrendo pela (i) distribuição lenta dos compostos entre a fase móvel e estacionária, (ii) convecção do analito devido a turbulências locais geradas pela passagem da fase móvel líquida através da fase estacionária ou (iii) por difusão axial.^{162,182} Para alcançar a maior resolução possível na

separação das zonas dos componentes, a dispersão em todas as partes do sistema é reduzida ao máximo.

Além das melhorias relacionadas aos dispositivos de análise em microfluxo, a miniaturização dos sistemas de LC também apresentam algumas vantagens particulares, tais como a possibilidade de separação de amostras com pouca disponibilidade (por exemplo, amostras forenses, clínicas pediátricas, proteômica e de célula única), devido ao pequeno volume necessário para as análises e melhor desempenho nas separações, graças a menor vazão (especialmente importante nas separações por troca iônica) e a melhor SVR das colunas miniaturizadas.^{183,184} Além das diversas aplicações dos sistemas miniaturizados de LC em misturas simuladas, exemplos de separações de amostras reais incluem peptídeos, proteínas, glicoproteínas, glicanos, enantiômeros e iso-prostaglandina.⁴⁸

Desta forma, com a progressiva redução no tamanho dos dispositivos de microanálise, melhoria da performance analítica e integração de um número cada vez maior de componentes em miniatura, os quais permitem a realização de diversas funções analíticas em uma mesma plataforma microfluídica, tornou-se possível a construção de dispositivos de microanálise totalmente portáteis para a realização de uma ampla variedade de ensaios, especialmente para análises *in situ*.

1.5 INTEGRAÇÃO E PORTABILIDADE EM DISPOSITIVOS MICROFLUÍDICOS

Os dispositivos microfluídicos apresentam uma grande diversidade de configurações e um número enorme de aplicações, entretanto, o objetivo final da maioria dos projetos (ou trabalhos) é o desenvolvimento de um sistema de análise totalmente portátil e automatizado, com capacidade de processamento rápido entre a inserção da amostra e a obtenção exata do resultado da análise, explorando a capacidade de integração de vários componentes e operações analíticas em um única plataforma miniaturizada.¹⁸⁵⁻¹⁸⁷

O desenvolvimento de dispositivos microfluídicos portáteis e totalmente integrados possibilita a realização da transição dos sistemas fabricados em laboratório para a aplicação em campo. Entretanto, até pouco tempo atrás, os dispositivos construídos necessitavam de componentes elétricos, mecânicos e ópticos complexos.^{89,188} Com o advento, nos últimos anos, dos módulos eletrônicos universais em miniatura, foi possível a fabricação de dispositivos microfluídicos portáteis mais simples, com um menor custo, um maior nível de automação e um alto volume de informações coletadas.

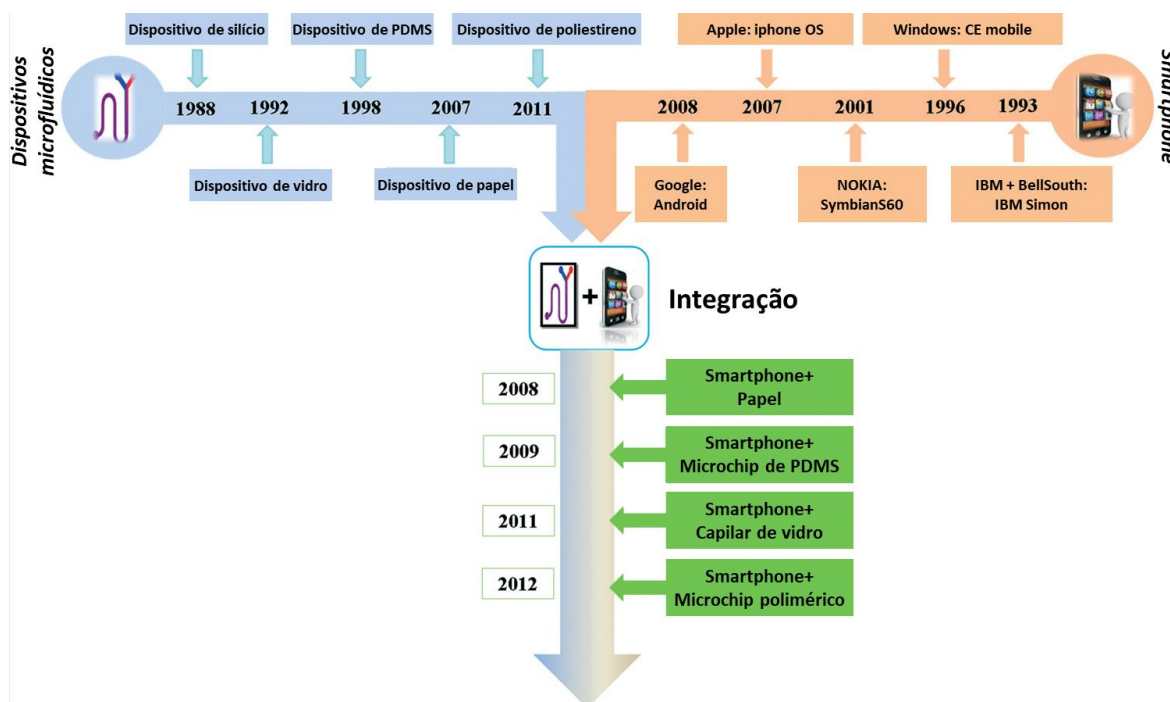
Os módulos eletrônicos universais miniaturizados são caracterizados por serem unidades programáveis genéricas de fonte aberta e tecnologia avançada, com custos

acessíveis e com uma implementação simples, dispensando conhecimento especializado em eletrônica, requerendo apenas a leitura de tutoriais sobre a sua instalação e utilização.¹⁸⁹⁻¹⁹¹ Circuitos integrados, placas de prototipagem, microcontroladores e arranjo de portas programáveis são alguns dos exemplos de módulos eletrônicos universais. Dentre eles, destacam-se os microcontroladores Arduino, Teensy, Raspberry Pi e Beagle Bone, devido a sua versatilidade e alta precisão, além de serem prontamente programados através de linguagens de alto nível, como C, C++, JavaScript ou Python e poderem ser conectados com *smartphones* e redes de teleinformática.¹⁹²

Alguns exemplos de dispositivos miniaturizados portáteis e autônomos incluem um sistema de amplificação de ácidos nucleicos contendo um cartucho de auto aquecimento ativado pela água,¹⁹³ um modulador térmico microfabricado para a transferência de amostras em cromatografia de fase gasosa,¹⁹⁴ uma célula combustível miniaturizada para fornecimento de energia elétrica para um sistema de bombeamento de soluções,¹⁹⁵ um dispositivo de papel contendo um diodo emissor de luz (*Light Emitting Diode* – LED) que era alimentado por células galvânicas quando a amostra era injetada¹⁹⁶ e um sistema autônomo e móvel na forma de robô, que continha um dispositivo microfluídico controlado por temperatura e integrado com eletroforese capilar, o qual poderia ser operado por controle remoto de longo alcance.¹⁹⁷ Além disso, como exemplo de sistema altamente integrado e com a produção de um volume grande de informações, tem-se um dispositivo desenvolvido para amostras ambientais, no qual foi inserido um misturador 3D, uma matriz de LEDs, um fotodetector e componentes eletrônicos de acompanhamento para a detecção colorimétrica de fenóis, cromo (VI) e nitrito em sete comprimentos de onda diferentes.¹⁹⁸

Além dos vários exemplos de dispositivos portáteis citados no parágrafo anterior, um grande desenvolvimento tem sido observado, nos últimos anos, para os sistemas baseados na integração dos dispositivos microfluídicos com *smartphones*, visto suas características em comum, tal como miniaturização, facilidade de operação e portabilidade.^{199,200} O primeiro *smartphone* foi fabricado pela IBM em 1993, sendo que a primeira geração de aparelhos possuía recursos limitados em termos de capacidade de processamento e duração da bateria. Assim como aconteceu os dispositivos microfluídicos, os *smartphones* também evoluíram muito ao longo dos anos (Figura 6), melhorando significativamente o seu desempenho e suas funcionalidades, com a incorporação de sensores contendo iluminação na parte de trás, processadores de alta capacidade e alimentação elétrica (através de bateria) feita diretamente na placa eletrônica.^{201,202}

Figura 6. Desenvolvimento histórico dos dispositivos microfluídicos, smartphones e dos dispositivos integrados.



FONTE: Adaptado da referência 199.

Desta forma, os *smartphones* e suas funções forneceram uma nova plataforma móvel, versátil e com alto desempenho para a integração com os dispositivos microfluídicos, sendo que em 2008 Martinez et al.²⁰³ foram os primeiros a desenvolver um sistema portátil construído a partir da integração de um *smartphone* e um dispositivo microfluídico baseado em papel, o qual foi aplicado na detecção de glicose e proteínas em urina artificial. Além dos dispositivos em papel, os *smartphones* também foram integrados em plataformas microfluídicas de outros materiais, tais como polímeros e vidro.

A integração dos *smartphones* aos dispositivos de microanálise portáteis permitiu também a realização de testes de diagnósticos convenientes e rápidos, com a transmissão dos dados das análises por longas distâncias e comunicação remota com um especialista para a troca de informações em tempo real.^{204,205} Além disso, tornou-se possível a realização de medidas altamente especializadas pela população em geral, devido a utilização de uma plataforma globalmente conhecida e aceita, como é o *smartphone*. As principais aplicações destes sistemas de micronálises abrangem as áreas ambientais e de segurança alimentar (detecção da poluição em água e alimentos), análises de rotina para a saúde (detecção de colesterol e glicose) e diagnósticos biomédicos (detecção de bactérias, patógenos, genes e ácidos nucleicos).¹⁹⁹

Por fim, dentre os diversos métodos de detecção utilizados em microanálises, as técnicas eletroquímicas são uma das mais empregadas em dispositivos miniaturizados portáteis, devido a fácil integração aos *smartphones* e aos componentes eletrônicos em miniatura (tais como os módulos eletrônicos universais) utilizados na construção dos sistemas de microanálise portáteis.²⁰⁶

1.6 TÉCNICAS ELETROQUÍMICAS

As técnicas eletroquímicas possuem uma grande importância dentre os métodos de análise química contemporâneos, devido a vantagens relacionadas com a boa sensibilidade, instrumentação com custo relativamente baixo e facilidade na operação com poucos requisitos de treinamento pessoal. Além disso, apresentam um grande potencial de uso na pesquisa básica e uma ampla variedade de aplicações em análises de rotina, tais como em determinações potenciométricas de pH, ensaios clínicos de eletrólitos, sondas para detecção amperométrica de oxigênio, controle dos níveis de glicose no organismo, medidas condutométricas do grau de mineralização da água, determinação coulométrica do teor de água em materiais não aquosos com base no método de Karl Fischer, entre outros.¹⁶⁹

As técnicas eletroquímicas apresentam também uma fácil integração com as plataformas microfluídicas, devido a características como rapidez, especificidade e simplicidade nas medidas e na instrumentação necessária. Além disso, o desempenho das análises eletroquímicas não são influenciadas pela redução no tamanho dos sistemas (ou seja, a miniaturização dos sensores eletroquímicos não afeta a sensibilidade de suas análises).²⁰⁷⁻²⁰⁹ As demais vantagens relacionadas com a integração das técnicas eletroquímicas com os dispositivos microfluídicos incluem a facilidade e baixo custo na microfabricação dos elementos eletroquímicos e o emprego de configurações eletrônicas simples e com baixa necessidade de energia, com os sinais elétricos sendo facilmente controlados e medidos através de sistemas digitais de aquisição e computadores,²¹⁰ os quais também podem ser miniaturizados (com dimensões de alguns centímetros) e alimentados eletricamente por baterias para a obtenção de sistemas de detecção eletroanalíticos em miniatura.^{211,212}

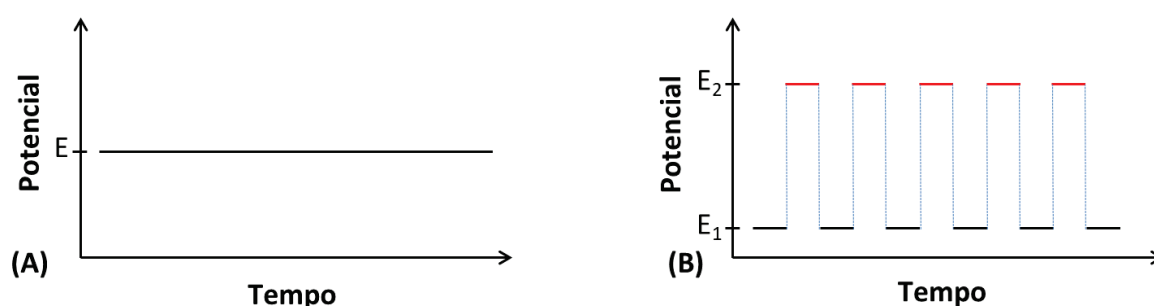
1.6.1 Técnicas amperométricas

Em microfluídica, as técnicas de detecção eletroquímicas mais utilizadas incluem a condutometria, a amperometria, a potenciomетria e a impedância, com destaque para a amperometria, a qual possui diversas vantagens para a realização de análises em

microfluxo, tal como baixo custo e robustez dos sensores amperométricos, alta sensibilidade, excelente reprodutibilidade, grande frequência analítica, ampla faixa linear de trabalho e menor efeito de contaminação e passivação dos eletrodos devido ao curto período de tempo com que a amostra e os produtos do processo redox ficam em contato com os eletrodos.²¹³ As medidas amperométricas são realizadas em células eletroquímicas contendo um sistema com três eletrodos: eletrodo de trabalho (WE), onde a reação eletroquímica envolvendo o analito ocorre, eletrodo de referência (RE), o qual funciona como um padrão de potencial, e contra eletrodo (CE), que tem a função de estabelecer a conexão elétrica na célula eletroquímica.

No modo convencional e mais utilizado, as medidas amperométricas são realizadas com a aplicação de um potencial (E) apropriado e fixo (Figura 7A) ao WE (em relação ao RE) de modo a polarizar este eletrodo, com a consequente geração de uma corrente entre o WE e o CE, a qual corresponde ao sinal analítico que é medido e monitorado em função do tempo.²¹⁴ Nas análises amperométricas, as condições de trabalho do sistema são ajustadas para que o sensor atue no modo limitado por difusão, onde a corrente será independente do potencial do WE. Desta forma, a corrente faradaica é controlada pela difusão das espécies e não pela cinética da reação dos eletrodos, garantindo uma dependência linear entre a corrente gerada e a concentração do analito.²¹⁵ No modo convencional, as medidas amperométricas permitem a determinação seletiva de apenas uma espécie de cada vez.

Figura 7. Forma de aplicação do potencial em função do tempo em medidas por (A) amperometria convencional e (B) amperometria de múltiplos pulsos.



FONTE: O autor (2018).

Para compostos eletroativos contendo potenciais redox distintos, a amperometria também permite a determinações simultâneas das espécies, através da utilização da amperometria de múltiplos pulsos (MPA), a qual é uma variação da amperometria convencional, e é baseada na utilização de pulsos de potenciais (máximo de 10 pulsos diferentes) aplicados a um único eletrodo de trabalho de forma alternada e contínua em função do tempo.^{216,217} Quando a separação dos processos eletroquímicos apresentados

pelos compostos for superior a 100 mV, os sinais amperométricos de cada espécie podem ser seletivamente medidos nos potenciais E_1 e E_2 (usando como exemplo a detecção de duas espécies) (Figura 7B). Em E_1 , apenas uma das espécies será reduzida ou oxidada, com o sinal amperométrico proporcional a concentração desta espécie. Já em E_2 , ambos os compostos irão sofrer um processo redox, com a obtenção de uma resposta amperométrica correspondente às duas espécies, sendo que a concentração do segundo analito é determinada pela diferença entre os sinais amperométricos obtidos em E_1 e E_2 .²¹⁸ Tal estratégia também pode ser empregada em uma célula eletroquímica em fluxo contendo dois eletrodos de trabalho em paralelo, um fixado no potencial E_1 e outro em E_2 . Assim, o emprego de MPA permite a detecção simultânea de espécies (que possuam diferentes potenciais redox) sem a necessidade de pré-tratamentos químicos na amostra, modificação do eletrodo ou utilização das técnicas quimiométricas para análise dos dados, possibilitando também uma redução no tempo de análise e no volume dos resíduos gerados.^{219,220}

Além da determinação simultânea de compostos, a MPA também pode ser empregada em análises eletroquímicas para vários outros objetivos. Um deles está relacionado com a limpeza periódica da superfície do eletrodo através da seleção de um pulso de potencial para este fim, com a detecção das espécies sendo realizada nos outros pulsos de potenciais.²²¹ Outra aplicação possível é a seleção de um pulso de potencial para a ativação constante do eletrodo de trabalho, com a formação de produtos intermediários ou modificações superficiais que favoreçam os processos de transferência de carga com os compostos a serem determinados, resultando em uma maior sensibilidade na resposta amperométrica.²²²

A MPA também apresenta a possibilidade de análises no modo gerador-coletor, onde a espécie de interesse é oxidada ou reduzida em um pulso de potencial (E_1) e o produto gerado é detectado no pulso subsequente (E_2), possibilitando a supressão do sinal gerado por possíveis espécies interferentes presentes na amostra que apresentem comportamento redox apenas em E_1 .²²³ Por fim, a MPA permite a aplicação do método do padrão interno nas análises amperométricas, com os pulsos de potencial sendo utilizados para detectar simultaneamente o analito e o composto utilizado como padrão interno, visto que o sinal de ambas as espécies serão afetadas igualmente por possíveis variações nos parâmetros de análise, tais como vazão, volume de injeção, temperatura e força iônica, ou ainda pelas alterações ocorridas na superfície do eletrodo ao longo das medidas.²²⁴

Graças a simplicidade dos sensores amperométricos, a sua integração com os dispositivos em miniatura é facilitada pela possibilidade na microfabricação dos eletrodos responsáveis pelas medidas eletroquímicas com os mesmos equipamentos e

metodologias empregados na construção dos canais microfluídicos. Assim, microeletrodos planares (2D) e tridimensionais (3D) podem ser construídos através de uma grande variedade de métodos, tais como pulverização catódica (*sputtering*),²²⁵ evaporação,²²⁶ litografia e técnicas de deposição de filmes espessos,²²⁷ permitindo um controle preciso na forma, tamanho e posição dos eletrodos, além da possibilidade na criação de arranjos de sensores ao longo dos canais microfluídicos.

Dentre os materiais empregados na construção de microeletrodos, os metais (principalmente ouro,²²⁸ platina²²⁹ e irídio²³⁰) são os mais utilizados em dispositivos microfluídicos com detecção amperométrica. Entretanto, devido a limitações como pequena janela de potencial e passivação ou incrustação do analito na superfície dos eletrodos metálicos, outros materiais começaram a ser utilizados, como as diferentes formas do carbono, com destaque para os eletrodos impressos (os quais são construídos com tinta a base de carbono)²³¹ e os eletrodos de diamante dopado com boro.²³² Por fim, para melhorar o desempenho eletroquímico, nanomateriais como nanopartículas,²³³ nanotubos²³⁴ e grafeno²³⁵ são empregados na modificação da superfície dos eletrodos, os quais aumentam a área superficial e realizam uma catálise eficiente do processo eletroquímico.

Além disso, para aumentar a seletividade nas medidas amperométricas, normalmente são construídos biossensores eletroquímicos (uma subclasse dos sensores químicos), os quais possuem um elemento de reconhecimento biológico (tal como enzimas, proteínas, anticorpos, ácidos nucleicos, células, tecidos ou receptores) e apresentam uma alta especificidade devido a reação seletiva com o analito, gerando um produto eletroativo que pode ser detectado e relacionado com a concentração da espécie a ser determinada.²³⁶

As enzimas, proteínas globulares compostas principalmente pelos 20 aminoácidos naturais que catalisam as reações bioquímicas, são o elemento de reconhecimento biológico mais antigo e ainda o mais utilizado em biossensores amperométricos, conferindo uma alta capacidade biocatalítica e especificidade nas análises.²³⁷ Com estruturas moleculares complexas e um arranjo específico dos aminoácidos em seu centro ativo, as enzimas conseguem se ligar de forma extremamente seletiva ao analito (mesmo em amostras complexas como urina e sangue), eliminando a necessidade do emprego de processos de pré-tratamentos e separação de compostos ou interferentes.²³⁸ Em muitos casos, as enzimas incorporam na estrutura do seu sítio ativo pequenos grupos químicos não proteicos, como cofatores ou grupos prostéticos, os quais auxiliam na especificidade pela espécie de interesse.

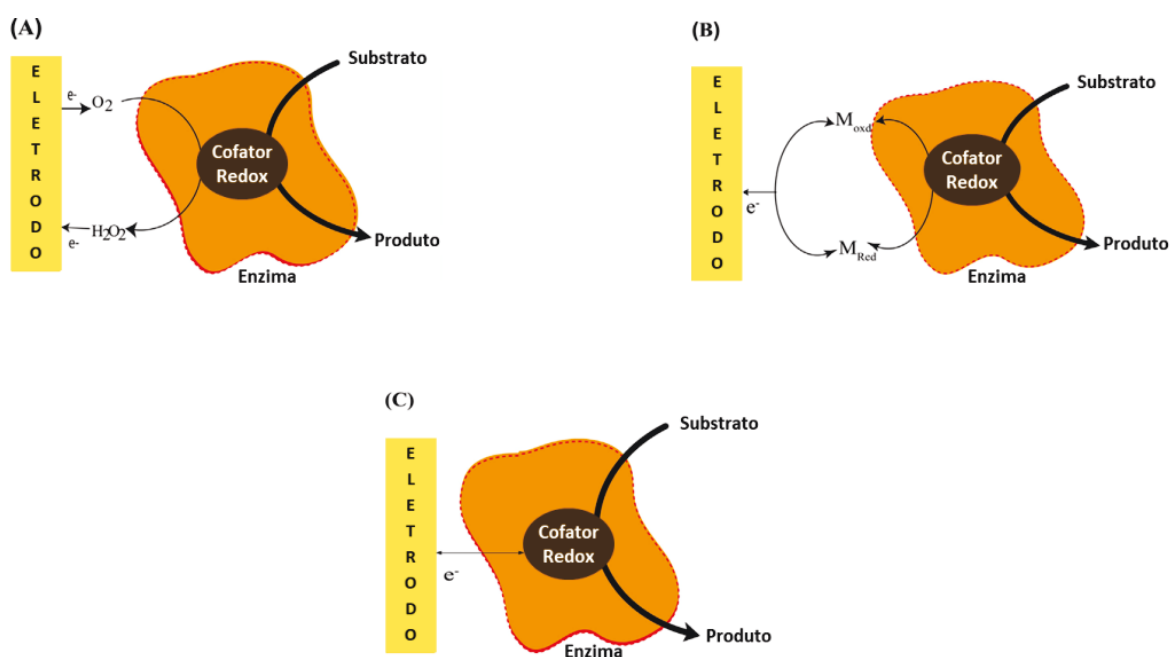
Desta forma, os biossensores amperométricos enzimáticos são descritos como sondas eletroquímicas que contêm uma fina camada de enzima imobilizada na superfície

do eletrodo de trabalho, combinando a alta especificidade das enzimas, com a sensibilidade dos transdutores eletroquímicos.²³⁹ Os biossensores enzimáticos normalmente apresentam construção simples, não requerem instrumentação cara, são fáceis de usar e compactos, podendo ser utilizados para três finalidades distintas:²⁴⁰

- i) Em dispositivos *off-line*, com as amostras sendo coletadas e os analitos sendo medidos através de equipamentos analíticos contendo um biossensor enzimático;
- ii) Sensores *in vivo*, com os biossensores sendo implantados no corpo (quase que exclusivamente em animais para pesquisa pré-clínicas), com detecção contínua das concentrações dos compostos de interesse.
- iii) Dispositivos *on-line*, com os biossensores integrados a sistemas de amostragem, os quais estão conectados ao corpo ou ao fluxo de um determinado material biológico, como por exemplo, as sondas de microdiálise.

De acordo com o método empregado para a transferência de elétrons das reações bioquímicas ou o grau de separação dos componentes do biossensor (transdutor, enzima, mediador e cofator), os biossensores amperométricos enzimáticos são divididos em três classes ou gerações (Figura 8).

Figura 8. Mecanismo de resposta dos biossensores amperométricos enzimáticos de (A) primeira geração, (B) segunda geração e (C) terceira geração.



FONTE: Adaptado da referência 243.

- **Biossensores de primeira geração:** são baseados na medida direta do aumento de um produto gerado enzimaticamente ou da diminuição do substrato da enzima, os quais se difundem para a superfície do transdutor, gerando uma resposta elétrica (Figura 8A). Nesta classe de biossensores, as enzimas utilizadas podem ser divididas em duas categorias principais, as oxidases e as desidrogenases, com ambas necessitando de coenzimas (NAD^+ , NADP^+ , NADH , NADPH , ATP , FAD , FADH) durante as catálises, que precisam ser regeneradas para a realização da reação enzimática subsequente. As enzimas oxidases utilizam o oxigênio molecular como um segundo substrato, de modo que os biossensores à base de oxidase são dependentes do oxigênio.²⁴¹

- **Biossensores de segunda geração:** também chamados de biossensores amperométricos mediadores, exploram compostos (mediadores) como agentes oxidantes para atuar como transportadores de elétrons (Figura 8B), apresentando como vantagens a realização de análises em potenciais menores, além de eliminar a dependência de O_2 e o impacto de moléculas interferentes. Dentre os mediadores empregados em biossensores enzimáticos, os mais comuns são o ferricianeto, ferroceno, azul de metileno, as fenazinas, o violeta de metilo, o azul de alizarina, o azul de prússia, a tiotina, o azul de O-toluidina e os íons redox inorgânicos. Para a construção de um biossensor de segunda geração, os mediadores podem ser adicionados na amostra ou imobilizados na superfície do eletrodo, juntamente com a enzima de interesse.^{239,242}

- **Biossensores de terceira geração:** nesta classe, a enzima é imobilizada diretamente na superfície do eletrodo de modo a possibilitar a transferência de elétrons entre o sítio ativo da enzima e o transdutor, sem a necessidade de mediadores redox (Figura 8C). Sendo assim, um biossensor de terceira geração consiste apenas de três componentes: a enzima como elemento de bio-reconhecimento, um composto para fixação da enzima (tal como um polímero condutor ou um material nanométrico) e o eletrodo como superfície de aprisionamento dos componentes do biossensor. O uso de um polímero redox ou de um nanomaterial para ligar o centro redox da enzima a superfície do eletrodo melhora o desempenho do biossensor, o qual apresenta tempos de resposta muito baixos e são relativamente independentes das concentrações de oxigênio e dos cofatores.²⁴³

Assim, as técnicas eletroquímicas apresentam uma grande versatilidade em suas medidas, devido aos diversos modos de operação e as inúmeras possibilidades de materiais e métodos para a modificação dos eletrodos, características que aliadas ao bom desempenho analítico (alta sensibilidade, resposta rápida, etc), fácil integração aos sistemas em miniatura e a necessidade de um pequeno volume de amostra, permitem a

realização de análises eletroquímicas de uma ampla variedade de compostos (tais como fármacos e biomarcadores) presentes nas mais diferentes matrizes.^{244,245}

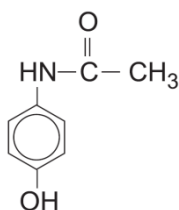
1.7 DETECÇÃO DE FÁRMACOS

O desenvolvimento de produtos farmacêuticos trouxe uma revolução para a saúde humana, atuando na prevenção e tratamento de inúmeras enfermidades. Entretanto, tais produtos só apresentam a eficácia esperada se estiverem livres de impurezas e forem ingeridos na quantidade apropriada.²⁴⁶ Além disso, altas concentrações de fármacos presentes no organismo ou no meio ambiente apresentam risco a saúde das pessoas e aos demais seres vivos.²⁴⁷ Assim, a detecção de fármacos possui grande importância na avaliação da pureza dos seus componentes, com a identificação e quantificação de eventuais impurezas; controle da estabilidade físico-química do fármaco devido a possibilidade de variação na concentração final ou geração de produtos de degradação; além do monitoramento de possíveis efeitos tóxicos com a determinação das concentrações dos fármacos presentes em amostras biológicas e ambientais.²⁴⁸ Dentre as diversas técnicas analíticas disponíveis para a detecção de fármacos, as mais utilizadas incluem as técnicas de titulometria, cromatografia, espectroscopia, eletroquímica e seus métodos correspondentes.²⁴⁹

1.7.1 Acetaminofeno e diclofenaco

O acetaminofeno (ACT) ou paracetamol (N-acetil-para-aminofenol) (Figura 9) é um fármaco com atividades analgésicas e antipiréticas, sendo um dos medicamentos mais utilizados em todo o mundo. Quando ingerido em doses terapêuticas normais, o ACT é seguro e não apresenta efeitos tóxicos para a saúde humana, sendo usado principalmente para aliviar dores de cabeça, além de ser o ingrediente principal em inúmeros remédios de resfriado e gripe.^{250,251} Entretanto, em doses excessivas pode causar erupções cutâneas, distúrbios hepáticos, nefrotoxicidade e inflamação do pâncreas.²⁵²⁻²⁵⁴

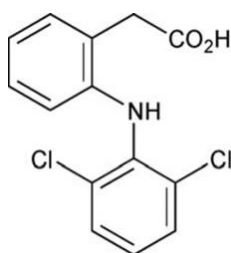
Figura 9. Estrutura molecular do acetaminofeno.



FONTE: Referência 250.

O diclofenaco (DCF) (ácido [2-(2,6-dicloroanilino)fenil] acético) (Figura 10) é um composto com propriedades anti-inflamatórias, analgésicas e antitérmicas, sendo indicado para artrite reumatóide, doença articular degenerativa, dores crônicas associadas ao câncer, cálculos renais e procedimentos endodônticos.^{255,256} Quando utilizado por longos períodos, o DCF pode causar aumento da pressão arterial em pacientes com diabetes mellitus e síndrome de Shy-Drager, além de problemas de circulação sanguínea, com risco de ataque cardíaco ou acidente vascular cerebral.^{257,258}

Figura 10. Estrutura molecular do diclofenaco.



FONTE: Referência 255.

O ACT e DCF também são muito utilizados em conjunto para o tratamento de problemas de entorses, estirpes, dor muscular e artrite em jovens e adultos e artrite reumatoide em idosos.²⁵⁹ A mistura de ACT e DCF também é empregada em cirurgias cardíacas, como alternativa para a diminuição do consumo de morfina durante tais procedimentos, além de ser utilizado no pós-operatório para a redução de náuseas e vômitos e ainda para aliviar a dor em cesarianas.^{260,261} Devido a meia-vida biológica curta apresentada pelo ACT e DCF, as doses terapêuticas e a frequência de aplicações da mistura dos fármacos são altas, causando como efeito colateral distúrbios gastrointestinais e ulcerações pépticas com sangramento.^{262,263} Além disso, o ACT e DCF são classificados como contaminantes emergentes em águas residuais e potável, os quais chegam aos corpos d'água através de várias rotas e afetam os ecossistemas aquáticos, com estudos relatando efeitos de estresse oxidativo em peixes e crustáceos,²⁶⁴⁻²⁶⁷ além de diminuição significativa na população de algas, cianobactérias e na biomassa bacteriana.²⁶⁸

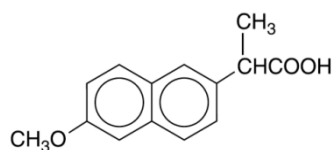
Desta forma, devido aos riscos a saúde e ao meio ambiente apresentados pelo ACT e DCF, a detecção simultânea destes compostos é muito importante. Entretanto, até o momento, não foi desenvolvido nenhum dispositivo microfluídico eletroquímico para a determinação simultânea de ACT e DCF, apenas para análises individuais dos fármacos.²⁶⁹⁻²⁷¹ Os ensaios simultâneos para tais compostos são limitados até o momento aos sistemas eletroquímicos convencionais, com trabalhos relatando o emprego das técnicas voltamétricas (varredura linear e pulso diferencial) com eletrodos de pasta de

carbono,²⁷² pasta de carbono modificado com brometo de cetiltrimetilamônio,²⁷³ carbono vítreo modificado com 4-fosfato fenil²⁵⁹ ou cloreto de poli (dialildimetilamônio).²⁷⁴

1.7.2 Naproxeno

O naproxeno (NPX) ou ácido (S)-2-(6-metoxi-2-naftil)propiónico (Figura 11), é um fármaco anti-inflamatório não esteróide amplamente utilizado em doenças como artrite reumatóide, doença articular degenerativa, espondilite anquilosante, gota aguda e dismenorréia primária.²⁷⁵ O mecanismo de ação do NPX se deve ao bloqueio das enzimas de ciclo-oxigenase que produzem prostaglandinas, uma classe de compostos com diversas funções importantes, tais como a promoção de inflamação, dor e febre.²⁷⁶ O NPX apresenta como principal efeito colateral a ocorrência de problema gastrointestinais, com a formação de úlceras, sangramento e até a perfuração do estômago.²⁷⁷ Além disso, sua administração deve ser feita com precaução para pessoas idosas, devido a possibilidade de problemas renais e aumento da pressão arterial.

Figura 11. Estrutura molecular do naproxeno.



FONTE: Referência 275.

A determinação de NPX é especialmente importante em formulações farmacêuticas pela possibilidade de modificação da matéria-prima que compõe o fármaco e também no produto final, devido a ação da temperatura, luz, umidade e pH, os quais podem produzir diferentes tipos de produtos de degradação.²⁷⁸ A análise de NPX também é importante em sistemas aquáticos, uma vez que o NPX é considerado um contaminante emergente para o meio ambiente, devido ao grande consumo deste fármaco pela população e eliminação inadequada, com altas concentrações (em $\mu\text{g L}^{-1}$) sendo encontradas em águas naturais e efluentes em plantas de tratamento de esgoto.²⁷⁹

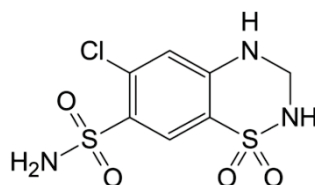
Exemplos de sistemas eletroquímicos convencionais empregados na determinação de NPX incluem análises por voltametria de pulso diferencial (DPV) em amostras de sangue empregando eletrodo de pasta de carbono modificado com nanopartículas de carbono,²⁸⁰ voltametria de onda quadrada (SWV) em amostras de urina com eletrodo de pasta de carbono modificado por nanofios de disprósio²⁸¹ e em amostras de comprimidos utilizando eletrodo de pasta de carbono contendo nanotubos de carbono,²⁸² além de detecção potenciométrica de NPX em amostras de leite bovino e

comprimidos empregando sensor baseado em β -ciclodextrina.²⁸³ Com relação aos dispositivos miniaturizados, apenas um sistema é relatado na literatura para a detecção de NPX, o qual é baseado em um sistema de eletroforese capilar fabricado em um *chip* com a determinação do fármaco em plasma sanguíneo através de um imunoenensaio eletrocínético, empregando um anticorpo marcado por fluorescência para capturar e detectar o NPX, com um tempo total de análise de 5 minutos.²⁸⁴

1.7.3 Hidroclorotiazida

A hidroclorotiazida (HCZ) ou 6-cloro-3,4-dihidro-2H-1,2,4-benzotiadiazina-7-sulfonamida-1,1-dióxido (Figura 12) é um fármaco popular da classe das tiazidas, amplamente utilizado como diurético. A HCZ atua no organismo reduzindo a reabsorção de eletrólitos pelos túbulos renais, aumentando assim a excreção de íons sódio e cloreto (e consequentemente de água), e em menor extensão, de íons potássio, resultando na diminuição da pressão arterial.²⁸⁵⁻²⁸⁷ Desta forma, o HCZ é utilizado no tratamento de edemas associados ao coração (insuficiência cardíaca congestiva), fígado (cirrose hepática) e rins (síndrome nefrótica, insuficiência renal crônica e glomerulonefrite aguda), além de ser empregada no tratamento de todos os graus de hipertensão.^{288,289} A HCZ está na lista de substâncias proibidas em práticas esportivas pela Comissão Médica do Comitê Olímpico Internacional, pois devido a sua ação diurética com a potente capacidade de remoção de água do corpo, promove a melhora da performance dos atletas pela rápida perda de peso, que pode ser necessária para atender a uma determinada categoria de competição (com limite de peso) ou mascarar a administração de outros agentes dopantes, devido ao aumento do volume de urina produzido.^{290,291}

Figura 12. Estrutura molecular do hidroclorotiazida.



FONTE: Referência 287.

Assim, a determinação de HCZ é necessária tanto em formulações farmacêuticas quanto (e principalmente) em amostras biológicas, devido a sua ampla ação no organismo. Os trabalhos relatados na literatura incluem a detecção eletroquímica de HCZ em amostras de sangue, urina e comprimidos comerciais empregando as técnicas de DPV, SWV e voltametria adsortiva de redissolução catódica com pulso diferencial

(AdSDPV) com eletrodos de pasta de carbono modificado com hexafluorofosfato de octilpiridínio e nanopartículas de hidróxido de cobre,²⁹² eletrodo impresso modificado com ácido L-glutâmico,²⁹³ carbono vítreo modificado com grafeno²⁹⁴ e pasta de carbono contendo óxido de grafeno.²⁹⁵ Com relação aos ensaios de HCZ com sistemas em miniatura, Kadavilpparampu et al.²⁹⁶ propuseram um dispositivo de microanálise contendo tris(2,2-bipiridina) rutênio(III) – Ce(IV) para a determinação por quimiluminescência de HCZ em fármacos e em plasma sanguíneo. Outra metodologia de microanálise foi desenvolvida por Alnajjar et al.²⁹⁷, a qual consistia em um sistema de eletroforese capilar integrada a um arranjo de fotodiodos para a detecção espectrofotométrica de HCZ e metoprolol em amostras de fármacos. Até o momento, não há relatos na literatura do desenvolvimento de nenhum dispositivo microfluídico com detecção eletroquímica para análise de HCZ.

1.8 DETECÇÃO DE BIOMARCADORES

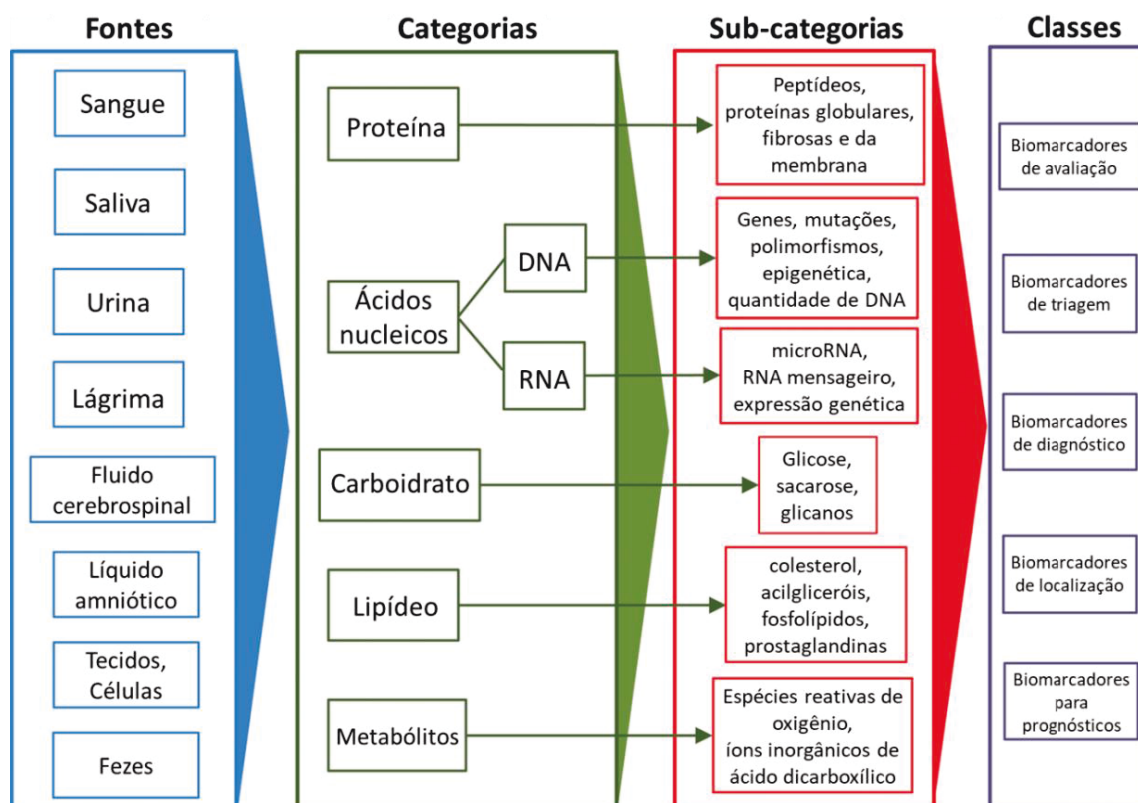
Os biomarcadores (ou marcadores biológicos) são produtos ou substâncias mensuráveis do organismo que são usados para o monitoramento dos processos fisiológicos ou patogênicos que ocorrem durante a saúde, a doença ou em resposta ao tratamento farmacológico.²⁹⁸ Na medicina, um biomarcador pode ser uma substância que é introduzida no organismo para examinar funções de órgãos ou outros aspectos da saúde, como os marcadores de tomografia computadorizada de emissão de fótons que são utilizados como isótopos radioativos para a avaliação do número de células produtoras de dopamina.²⁹⁹ Uma substância indicadora de um estado de doença particular também pode ser classificada como um biomarcador, tal como os anticorpos do receptor da acetilcolina que indicam a miastenia grave. O monitoramento dos biomarcadores trazem uma série de benefícios à saúde das pessoas, tais como maior capacidade de prevenção de doenças devido à identificação de predisposição e risco, auxílio no diagnóstico e prognóstico, tratamento eficiente das enfermidades, além da avaliação da resposta terapêutica e na consequente redução nos custos relacionados aos cuidados com a saúde.^{300,301}

Para que uma substância seja empregada como biomarcador, ela precisa atender a alguns critérios, tal como ser representativo de uma condição específica, ou seja, apresentar variação exclusivamente devido ao processo que esteja sendo monitorado. Para facilitar a detecção, os biomarcadores devem estar presentes em amostras que podem ser facilmente coletadas, processadas e armazenadas.³⁰² As concentrações do biomarcador na população controle não devem apresentar variações, de modo que qualquer pequena alteração possa ser detectada com confiabilidade. Além disso, é

necessária a existência de métodos de análises confiáveis para a detecção do biomarcador de interesse, além de outras características desejáveis como alta precisão, reprodutibilidade, especificidade, sensibilidade, rapidez, baixo custo e simplicidade, as quais podem ser alcançadas parcialmente ou na totalidade com o emprego de metodologias baseadas em dispositivos microfluídicos.^{303,304}

Os compostos que após uma análise estatística adequada, aparecem em excesso ou em baixas quantidades nas amostras coletadas dos pacientes, em comparação com controles saudáveis, podem ser considerados como biomarcadores potenciais de alguma doença. Milhares de biomarcadores são relatados na literatura, porém, apenas 100 deles são utilizados regularmente em análises clínicas. Em geral, os biomarcadores podem ser classificados em cinco categorias principais: lipídeos, carboidratos, ácidos nucleicos, proteínas e metabólitos, e podem ser obtidos das mais diversas bio-amostras, como sangue, saliva, urina, lágrima, fluido cerebrospinal, líquido amniótico, tecidos/células e fezes (Figura 13), algumas das quais possuindo um pequeno volume, o que torna a análise com dispositivos microfluídicos muito atraente.^{29,305,306} Dentre as inúmeras técnicas de detecção de biomarcadores, as mais importantes incluem a detecção colorimétrica, por fluorescência, quimioluminescência, eletroquimioluminescência, eletroforese capilar, além dos métodos eletroquímicos e cromatográficos.^{307,308}

Figura 13. Organização geral dos biomarcadores, incluindo as principais fontes, categorias, sub-categorias e aplicações.

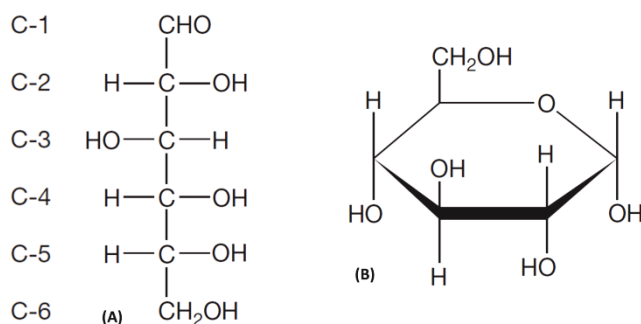


FONTE: Adaptado da referência 29.

1.8.1 Glicose

A glicose ou dextrose é um monossacarídeo e um dos carboidratos mais importante na biologia, sendo a principal fonte de energia dos vertebrados. A glicose está presente em frutas e vegetais e, juntamente com a frutose e sacarose, são os responsáveis pelo sabor doce dos alimentos.³⁰⁹ A molécula de glicose contém seis átomos de carbono e um grupo aldeído, sendo considerada como uma aldo-hexose, possuindo tanto a forma de cadeia aberta (acíclica) quanto de cadeia fechada (cíclica) (Figura 14). Devido a estrutura semelhante ao pirano, a forma cíclica da glicose, a qual é resultante de uma reação intermolecular entre o átomo de carbono C-1 do grupo aldeído e o carbono C-5 do grupo hidroxila, também é referida como glucopirano, onde cada átomo de carbono está ligado a uma hidroxila, com exceção do quinto átomo que está ligado ao sexto átomo de carbono fora do anel.^{310,311} Em solução aquosa, as estruturas de glicose estão em equilíbrio, com predominância da forma cíclica.

Figura 14. Estrutura molecular da D-glicose com (A) cadeia aberta e (B) cadeia fechada.



FONTE: Adaptado da referência 309.

A glicose é o açúcar simples mais importante no metabolismo humano, armazenada principalmente no fígado e nos músculos na forma de glicogênio, sendo um dos principais biomarcadores do organismo, amplamente utilizada em estudos por químicos, bioquímicos, biólogos e microbiologistas para avaliar os processos celulares e a saúde das pessoas.³¹² O monitoramento dos níveis de glicose presentes no corpo é especialmente importante por causa do diabetes mellitus, uma doença que é considerada um problema de saúde pública mundial, com taxas quase epidêmicas, sendo uma das principais causas de morte e deficiência no mundo.^{313,314}

O diabetes mellitus tem como principal característica a elevação dos níveis de glicose no sangue (hiperglicemia), que é causada pela produção insuficiente de insulina (hormônio que auxilia na absorção da glicose nas células do corpo) pelo pâncreas, levando ao diabetes tipo 1, ou pelo incapacidade do organismo em usar a insulina

produzida, causando o diabetes tipo 2.³¹⁵ Se não tratado, o diabetes pode causar a longo prazo complicações graves de saúde, incluindo cegueira, doenças cardíacas e insuficiência renal.³¹⁶

Para minimizar os riscos à saúde, o tratamento do diabetes inclui o controle rigoroso da glicose no organismo, através do monitoramento frequente dos níveis deste biomarcador no sangue e ingestão da quantidade de insulina necessária para o corpo.³¹⁷ Assim, para garantir que os níveis de glicose no sangue fiquem dentro de um intervalo seguro, os pacientes com diabetes devem realizar várias medições ao longo do dia, visto que diversos fatores influenciam a concentração de glicose, como o tempo das refeições, tipo e dosagem de insulina, exercício, infecções, entre outros.³¹⁸

O método mais utilizado para o monitoramento dos níveis de glicose no sangue baseia-se em dispositivos portáteis (*point-of-care*) disponíveis comercialmente, os quais fazem um pequeno furo no dedo para obter uma gota de sangue e realizar a análise através de um glucômetro eletroquímico, o qual contém uma tira descartável que consiste em um eletrodo impresso contendo as enzimas glucose oxidase ou glucose desidrogenase.³¹⁹ Embora este método obtenha resultados precisos, a necessidade de realizar várias picadas no dedo ao longo do dia desagrada os pacientes, seja pela dor ou por outros inconvenientes, tais como danos ocasionados ao dedo continuamente perfurado, com a formação de cicatrizes maciças e perda da sensibilidade, levando até a um controle não eficiente dos níveis de glicose e indução de hipoglicemia.³²⁰ Além disso, nos ensaios clínicos, a determinação dos níveis de glicose no organismo também é feita através do sangue, com a coleta intravenosa de uma alíquota deste fluido e posterior análise.

Para minimizar os transtornos aos pacientes relacionados aos testes de glicose no sangue e tornar as análises menos invasivas, outros fluidos corporais podem ser empregados, os quais incluem a saliva,³²¹ suor,³²² lágrima,³²³ fluido intersticial,³²⁴ urina,³²⁵ etc. Dentre eles, a lágrima destaca-se como uma das melhores alternativas para o monitoramento indireto dos níveis de glicose no sangue, devido ao fácil acesso a este fluido, excelente correlação com os níveis presentes no sangue ao longo de uma ampla faixa de concentração de glicose e uma matriz menos complexa (poucas espécies potencialmente interferentes) quando comparada com outros fluidos corporais.^{326,327}

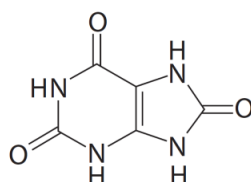
As metodologias de análise de glicose em lágrima normalmente empregam dispositivos em miniatura, os quais permitem a realização de medidas minimamente invasivas, com maior sensibilidade e com a necessidade de um volume extremamente reduzido de lágrima. Exemplos de sistemas de análise de glicose em lágrima incluem um sensor nanoestruturado de transferência de energia de ressonância de fluorescência baseado em pontos quânticos (*quantum dots*) de CdSe/ZnS como doador e verde

malaquita ligada a dextran e conjugado com concanavalina A (enzima com afinidade específica para glicose) como receptor;³²⁸ ensaios colorimétricos empregando biossensores baseados em papel;^{329,330} biossensores amperométricos construídos com eletrodo de carbono impresso contendo glicose desidrogenase com flavina adenina dinucleotídeo (GDH-FAD)³³¹ ou em fio de Pt/Ir modificado com glicose oxidase;³³² além dos sensores e biossensores construídos em lentes de contato com detecção por espectrometria^{333,334} ou amperometria.³³⁵

1.8.2 Ácido úrico

O ácido úrico (UA) (2,6,8-trihidroxipurina) (Figura 15) é o produto final do metabolismo do corpo humano, resultante da degradação das purinas dietéticas ou endógenas através da enzima xantina oxidase, sendo encontrado principalmente no sangue e na urina (onde é excretado).^{336,337} O UA apresenta funções benéficas no organismo, atuando como antioxidante, mas também possui muitos efeitos negativos, como a estimulação da proliferação de células musculares lisas vasculares e indução de disfunção endotelial. Desta forma, a UA tem sido empregado como um biomarcador da saúde e do estado nutricional das pessoas, com o monitoramento regular das suas concentrações no plasma sanguíneo e na urina.³³⁸

Figura 15. Estrutura molecular do ácido úrico.



FONTE: Referência 337.

Elevações dos níveis de UA no sangue geralmente resultam de um aumento na produção endógena, na redução da sua excreção ou ainda na combinação de ambas as situações, sendo indicativo de risco para o desenvolvimento de diversas doenças. Uma das enfermidades mais importantes é gota, a qual afeta milhões de pessoas em todo o mundo e é causada pelo acúmulo de UA no corpo, levando a formação de cristais em articulações, tendões e tecidos circundantes.^{339,340} Outra doença relacionada a elevação dos níveis de UA no organismo é a hiperuricemia, a qual é comumente observada em associação com a resistência à insulina, sendo um indicador do desenvolvimento de obesidade, hipertensão, diabetes mellitus tipo 2 e de doenças cardiovasculares. Alterações dos níveis de UA também podem indicar o desenvolvimento da síndrome de

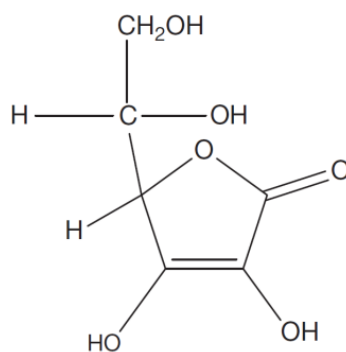
Lesch-Nyhan, a qual é uma enfermidade metabólica rara e hereditária causada pela deficiência da enzima hipoxantina guanina fosforibosiltransferase, além da síndrome da lise tumoral, que afeta pacientes que receberam quimioterapia e é causada pelos produtos da degradação das células cancerígenas resultando em insuficiência renal aguda.^{341,342}

Desta forma, a determinação dos níveis de UA no organismo é um requisito fundamental para o diagnóstico clínico e tratamento de diversas doenças importantes. Vários exemplos de dispositivos miniaturizados utilizados para a determinação de UA em fluidos corporais são relatados na literatura, os quais incluem sistemas para análise de UA em saliva, urina e sangue pelas técnicas de fluorescência,³⁴³ colorimetria,³⁴⁴⁻³⁴⁶ eletroforese,^{347,348} quimioluminescência,^{349,350} cronoamperometria³⁵¹ e por um sistema miniaturizado com dupla detecção (espectrofotometria e fluorescência).³⁵²

1.8.3 Ácido ascórbico, dopamina e epinefrina

O ácido ascórbico (AA) (Figura 16), também conhecido como vitamina C, é um nutriente dietético antioxidante essencial para o corpo, com muitas funções fisiológicas e bioquímicas. O ser humano, assim como vários outros animais, são incapazes de sintetizar o AA devido a ausência da enzima gulonolactona oxidase, a qual produz AA a partir da glicose.^{353,354} Assim a vitamina C é obtida apenas pela dieta, de modo a manter um funcionamento metabólico normal do corpo. Muitas frutas e vegetais incluindo as frutas cítricas, goiaba, tomate, pimentões vermelhos e verdes, kiwi e brócolis são as fontes predominantes de vitamina C e suprem mais de 80% das necessidades diárias dos seres humanos. Além disso, na indústria de alimentos, o AA é amplamente utilizado como antioxidante para evitar a formação de nitrosaminas carcinogênicas em carnes e embutidos.^{355,356}

Figura 16. Estrutura molecular do ácido ascórbico.

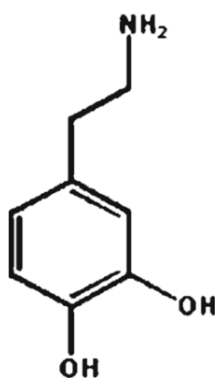


FONTE: Referência 353.

O nível baixo de AA no organismo (causado por uma dieta insuficiente em vitamina C) leva a uma condição letal conhecida como escorbuto, doença caracterizada por mudanças gengivais, dor nas extremidades e hemorragia que leva a morte.³⁵⁷ Já níveis marginais e sub-ótimos de AA no organismo podem causar um alto estresse oxidativo, o qual está associado a um maior risco no desenvolvimento de câncer, doenças hepáticas e diabetes mellitus.^{358,359} Além disso, pesquisas mostraram evidências sobre a eficiência do AA na prevenção e/ou tratamento de diversas doenças como câncer, asma, rinite alérgica, dermatite atópica, doenças cardiovasculares, obesidade, doenças neurodegenerativas, hipertensão e doenças auto-imunes.³⁶⁰⁻³⁶²

A dopamina (DA) (3,4-di-hidroxi fenetilamina) (Figura 17) é uma molécula catiônica orgânica da família das catecolaminas sintetizada através de reações enzimáticas de L-DOPA, sendo encontrada em diversos fluidos corporais e nos tecidos cerebrais, desempenhando um papel vital na operação normal do sistema nervoso central, cardiovascular, renal e hormonal.³⁶³ No cérebro, a DA atua como um neurotransmissor e no controle motor, regulando a liberação de diversos hormônios. A dopamina atua também como um mensageiro químico local fora do sistema nervoso, inibe a liberação da norepinefrina nos vasos sanguíneos e em concentrações normais, funciona como um vasodilatador.³⁶⁴ Além disso, a DA aumenta a excreção de sódio e a produção de urina nos rins, reduz a produção de insulina no pâncreas e a atividade dos linfócitos no sistema imunológico, e ainda diminui a motilidade gastrointestinal, atuando na proteção da mucosa intestinal no sistema digestivo.³⁶⁵

Figura 17. Estrutura molecular da dopamina.



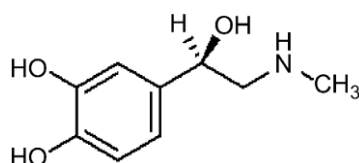
FONTE: Referência 363.

O desequilíbrio nos níveis de DA no organismo causam uma série de doenças, como o transtorno do déficit de atenção com hiperatividade, depressão, vícios, doença de Parkinson, Alzheimer, Esquizofrenia e doença de Huntington.³⁶⁶ Portanto, a determinação simples e rápida dos níveis de DA no corpo através de métodos de detecção altamente

sensíveis é de fundamental importância para o monitoramento da saúde das pessoas e para o diagnóstico de doenças.³⁶⁷ Além disso, o monitoramento de DA em muitos dos fluidos corporais (tais como fluido cérebro espinhal, lágrima, etc) apresenta um pequeno volume de amostra e a necessidade de sistemas portáteis e/ou ensaios *in situ*.

A epinefrina (EP) ((R)-4-(1-hidroxi-2-(metilamino)etil) benzeno-1,2-diol) ou adrenalina (Figura 18) é um neurotransmissor da família das catecolaminas (juntamente com a dopamina e a norepinefrina) e é o principal hormônio liberado pelas glândulas supra-renais, apresentando funções fisiológicas e efeitos farmacológicos específicos. A EP é sintetizada pelo organismo em situações de fortes emoções ou estresse, como luta, fuga, excitação e medo, desempenhando um papel significativo no estresse mental ou físico, além de estimular uma série de comportamentos do sistema nervoso central.^{368,369} Assim como acontece com a DA, alterações nos níveis de EP nos fluidos corporais estão relacionados com graves problemas de saúde, incluindo doença de Parkinson, Esquizofrenia e doença de Alzheimer. Além disso, a EP tem a incrível capacidade de afetar o humor e a clareza mental, como o pensamento negativo, ganho de peso, fadiga, ansiedade, problemas digestivos, insônia, hipomania, etc.^{370,371}

Figura 18. Estrutura molecular da epinefrina.



FONTE: Referência 369.

Uma alta concentração de EP no sangue afeta a pressão arterial, o sistema imunológico, a frequência cardíaca, a lipólise e o metabolismo do glicogênio, funcionando como um potente estimulante, permitindo aos esportistas melhorar a sua força e velocidade. Por isso, o seu uso foi proibido em competições de atletismo pela Agência Mundial Antidoping.^{372,373} Na medicina, a EP é usada como um medicamento de emergência comum para tratar asma brônquica, infarto do miocárdio, reações alérgicas graves, hipertensão e parada cardíaca. Diversas doenças causam alterações na concentração da EP, tais como crise hipertensiva, angina, ataques de asma, hepatite, cirrose do fígado e lesão cerebral. Além disso, a determinação de EP na urina permite estabelecer a localização de tumores de tecido adrenal e nervoso.³⁷⁴ Desta forma, a detecção de EP tem atraído muita atenção dos cientistas, tanto em estudos para o entendimento da sua ação fisiológica quanto para o diagnóstico e tratamento de doenças, a fim de evitar os efeitos colaterais da sobredosagem.³⁷⁵⁻³⁷⁷

Em muitas situações, os biomarcadores (incluindo AA, DA e EP) coexistem nos fluidos corporais, tornando necessária a determinação simultânea, sensível e seletiva destes compostos em áreas como da pesquisa básica, biomedicina, diagnóstica, saúde e patologia.³⁷⁸⁻³⁸⁰ A detecção eletroquímica simultânea de AA e DA ou EP possui como principal obstáculo a sobreposição dos seus sinais anódicos, devido a estas espécies possuírem potenciais de oxidação muito próximos, resultando em análises com baixa seletividade.^{381,382} Uma forma de contornar este problema é a utilização de diversos tipos de materiais para a modificação da superfície dos eletrodos, sendo os mais comuns as nanopartículas metálicas (Au, Pd, Pt),³⁸³⁻³⁸⁵ os polímeros condutores³⁸⁶⁻³⁸⁸ e os nanomateriais a base de carbono (grafeno e nanotubos).³⁸⁹⁻³⁹¹ Embora eficiente, a modificação dos eletrodos adiciona uma etapa extra (em muitos casos complexa e demorada) no método de análise, além de aumentar o custo dos ensaios.

Como alternativa, medidas eletroquímicas simultâneas de AA e DA (ou EP) podem ser realizadas através da separação prévia das espécies em materiais celulósicos (como papel e fios de algodão), os quais atuam como uma coluna cromatográfica que é conectada a região de detecção eletroquímica por um sistema em fluxo. Tal estratégia foi explorada por Murphy et al.³⁹² em um dispositivo microfluídico construído em papel para a análise simultânea de AA e DA, além de sistemas similares sendo utilizados para a separação cromatográfica de misturas de AA e UA e de paracetamol e 4-aminofenol com a posterior detecção eletroquímica das espécies.^{393,394}

Portanto, do modo a realizar determinações simples e baratas dos fármacos e biomarcadores descritos anteriormente, além de aprimorar as características das medidas realizadas com dispositivos em papel, fios de algodão hidrofílicos foram utilizados como canal microfluídico para a construção de plataformas miniaturizadas eletroanalíticas versáteis e de baixo custo com capacidade de realizar ensaios em microfluxo através de variadas configurações e diferentes metodologias de análise.

2 OBJETIVO GERAL

Construir e desenvolver dispositivos baseados em canais microfluídicos feitos com fios de algodão e materiais de baixo custo para a realização de análises em microfluxo visando aplicações eletroanalíticas.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- i) Montar os dispositivos microfluídicos baseado em fios de algodão e com materiais de baixo custo;
- ii) Avaliar os dispositivos com relação ao transporte de soluções e desempenho analítico;
- iii) Caracterizar a superfície dos fios e eletrodos por microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectroscopia de raios-X por energia dispersiva (EDS), microtomografia de raios-X, espectroscopia Raman e espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR);
- iv) Otimizar as características dos dispositivos microfluídicos, avaliando as melhores configurações para a realização de análise em microfluxo;
- v) Construir e integrar um biossensor ao dispositivo microfluídico;
- vi) Fazer tratamentos nos fios que compõem o canal microfluídico do dispositivo para a separação de compostos;
- vii) Desenvolver um dispositivo microfluídico totalmente portátil;
- viii) Aplicar os dispositivos microfluídicos, sob condições otimizadas, na determinação de amostras reais de fármacos e biomarcadores corporais.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 REAGENTES

Os reagentes utilizados em todas as etapas do trabalho estão listados na Tabela 1, os quais foram utilizados sem purificação prévia. Todas as diluições foram feitas em água destilada e purificada pelo sistema Milli-Q da Millipore (Direct-Q3; Millipore Corporation, Bedford, MA, USA), com resistividade maior que 18,2 MΩ cm. Os reagentes foram pesados em balança analítica Mettler Toledo, Modelo AL204 (Columbus, OH, USA), com precisão de $\pm 0,1$ mg. As medidas de pH das soluções foram realizadas em pHmetro Metrohm 780, com eletrodo combinado de vidro Ag/AgCl KCl 3,0 mol L⁻¹.

Tabela 1. Relação de reagentes utilizados nos experimentos do projeto.

Reagente	Marca	Pureza
Fosfato de sódio monobásico monohidratado P.A.	Synth	98,0 – 102,0%
Fosfato de sódio dibásico anidro P.A.	Vetec	> 99,0%
Acetaminofeno	Alchimia	> 99,0%
Diclofenaco de potássio	Alchimia	> 99,0%
Naproxeno	Alchimia	> 99,0%
GOx (purificada de <i>Aspergillus niger</i>)	Sigma-Aldrich	150 U mg ⁻¹
D-(+)-glicose anidra	Sigma-Aldrich	≥ 99,5%
Azul de O-toluidina	SEM	> 85,0%
Ácido acético glacial P.A.	Neon	> 99,9%
Acetato de sódio anidro P.A.	Vetec	99,0 – 101,0%
Hidróxido de sódio P.A.	CRQ	> 97,0 %
Ácido ascórbico P.A.	Sigma-Aldrich	≥ 99,0%
Ácido cítrico monoidratado P.A.	Biotec	> 99,5%
Cloridrato de dopamina	Sigma-Aldrich	98,0%
Hidroclorotiazida	Lidifarma	99,4%
Ácido úrico	Sigma-Aldrich	≥ 99,0%
Epinefrina	Sigma-Aldrich	≥ 95,0%

FONTE: O autor (2018).

As soluções de tampão fosfato (PB) pHs 6,0 – 8,0 foram preparadas a partir dos sais de fosfato de sódio monobásico monohidratado P.A. e fosfato de sódio dibásico anidro P.A. Para o preparo das soluções de tampão acetato pHs 3,8 – 5,0, foram utilizados ácido acético glacial P.A. e acetato de sódio anidro P.A.

3.2 CONSTRUÇÃO E FUNCIONAMENTO DOS μ TEDS

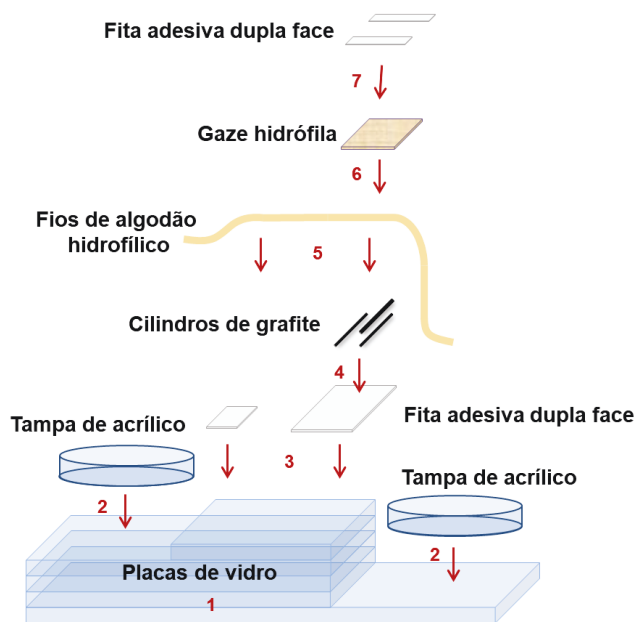
Os estudos do projeto foram agrupados em cinco partes, cada qual correspondendo a um dispositivo microfluídico diferentes, os quais apresentavam algumas características e funções distintas, mas todos tendo por objetivo a realização de análises em microfluxo com detecção eletroquímica, empregando fios de algodão como canal microfluídico, materiais acessíveis e processos de fabricação simples. Desta forma, os materiais e os processos de construção empregados nos cinco dispositivos são descritos a seguir.

3.2.1 Parte I – μ TED-1

A construção do dispositivo proposto nesta parte do trabalho foi caracterizada pela simples montagem dos seus componentes, os quais incluem placas de vidro com 25 mm de largura e 6,5 mm de espessura, tampas de acrílico com capacidade para 4,0 mL de solução, fita adesiva dupla face, cilindros de grafite (0,5 e 0,7 mm de diâmetro) utilizados em lapiseira e gaze hidrófila estéril de algodão. Para a confecção das placas dos vidros no comprimento desejado, foi utilizado um cortador de vidros LKB 7800 (Melbourne, Austrália). Além disso, para auxiliar na montagem do dispositivo, foram utilizados como acessórios pinça de ponta fina, régua, tesoura e fita adesiva transparente. A montagem do μ TED-1 seguiu a sequência descrita a seguir e ilustrada esquematicamente na Figura 19:

- (1) Junção de placas de vidro com comprimentos de 90 mm (1 placa), 60 mm (3 placas) e 30 mm (1 placa) com o auxílio de fita adesiva transparente, de modo a obter uma diferença de altura em suas extremidades;
- (2) Fixação de 2 tampas de acrílico, uma em cada extremidade das placas de vidro;
- (3) Colocação de um pedaço de fita adesiva dupla face perto de cada tampa de acrílico;
- (4) Acomodação de três cilindros de grafite (sendo dois deles com diâmetro de 0,5 mm e o terceiro com diâmetro de 0,7 mm) sobre a fita adesiva dupla face fixada perto do tampa de acrílico inferior;
- (5) Fixação de 8 fios de algodão hidrofílicos unidos (retirado da gaze hidrófila) ao longo de todo o dispositivo, se estendendo de uma tampa de acrílico até a outra;
- (6) Deposição de um pedaço de gaze hidrófila sobre a região que contém os cilindros de grafite;
- (7) Colocação de dois pedaços de fita adesiva dupla face sobre as extremidades da gaze hidrófila.

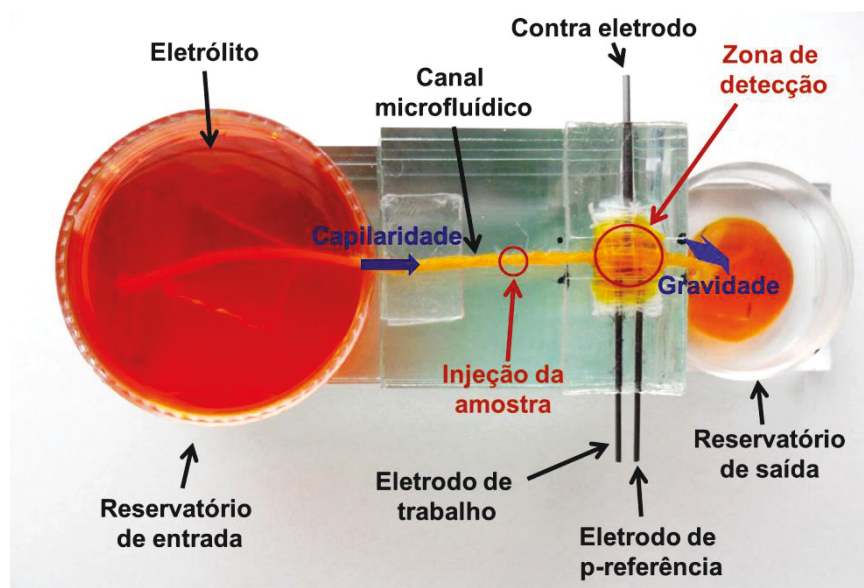
Figura 19. Esquema do processo de fabricação do μ TED-1 ilustrando os materiais que compõe o dispositivo e as etapas de montagem (representadas pelos números 1 a 7).



FONTE: O autor (2018).

Após a realização das 7 etapas descritas anteriormente, o dispositivo estava pronto para o uso. Para a demonstração do princípio de operação do μ TED-1 e melhor visualização do caminho que a solução percorre ao longo do dispositivo, corante alimentar laranja foi adicionado no eletrólito de suporte (Figura 20). Inicialmente, para a realização das análises, a solução correspondente ao eletrólito de suporte deve ser adicionada no reservatório de entrada (tampa de acrílico), sendo gerado um fluxo contínuo ao longo do μ TED-1 pelo canal microfluídico (fios de algodão hidrofílicos) devido à ação capilar e gravitacional. O mecanismo de transporte das soluções envolve inicialmente a ação capilar, com o preenchimento dos espaços nanométricos entre as fibrilas presentes na parede de celulose de cada fibra de algodão, pela difusão da solução para dentro de cada fibra, preenchendo o lúmen, e principalmente com o transporte de soluções nos espaços entre as fibras e entre os fios.^{127,152,395,396} Devido a diferença de altura entre o reservatório de entrada e saída (26 mm), a força gravitacional que age sobre a região vertical do canal microfluídico cria um efeito sifão, forçando o deslocamento do eletrólito para o reservatório de saída, criando um fluxo contínuo das soluções ao longo do dispositivo. A uma distância de 10 mm dos eletrodos ocorre a injeção do analito (2,0 μ L), o qual é transportado juntamente com o eletrólito de suporte para a zona de detecção, onde ocorrem as reações redox das espécies de interesse com a detecção através de uma técnica eletroquímica, com os cilindros de grafites funcionando como eletrodos. Por fim, o eletrólito de suporte e o analito são levados para o reservatório de saída, permitindo a realização de uma nova injeção do analito.

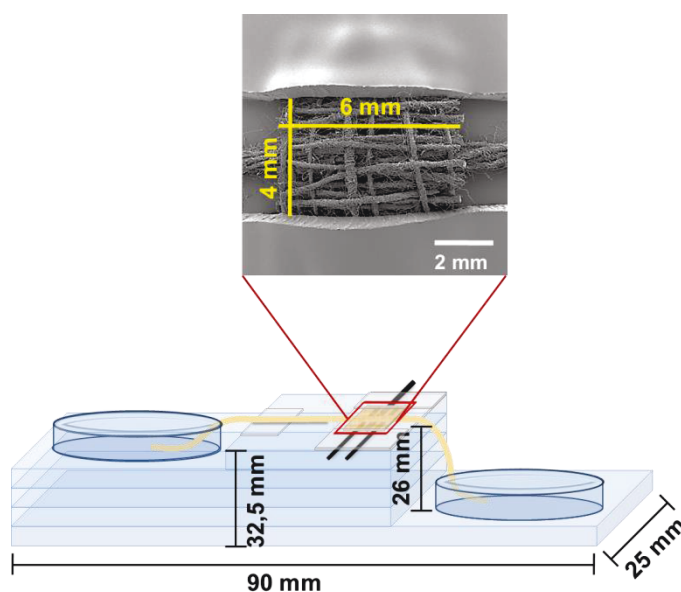
Figura 20. Fotografia do μ TED-1 com as indicações dos principais componentes e do princípio de operação do dispositivo.



FONTE: O autor (2018).

O μ TED-1 possuía dimensões totais de 90 mm comprimento, 25 mm de largura, 32,5 mm de altura e uma diferença de altura de 26 mm entre os reservatórios de entrada e saída (Figura 21). Além disso, a zona de detecção ou célula eletroquímica (detalhe na Figura 21), a qual é composta pelos cilindros de grafite e delimitada pela gaze hidrófila e pelos pedaços de fita adesiva dupla face tinha 6 mm de comprimento e 4 mm de largura.

Figura 21. Ilustração do dispositivo após o processo de montagem mostrando as suas respectivas dimensões. No detalhe, micrografia de MEV da zona de detecção do μ TED-1.



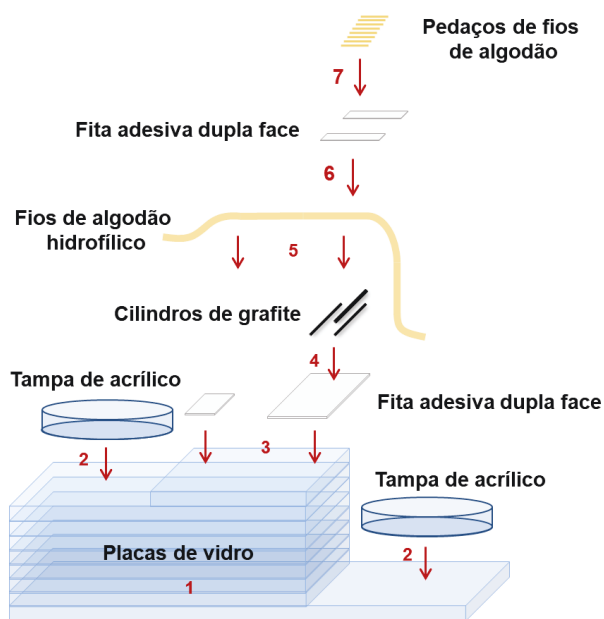
FONTE: O autor (2018).

3.2.2 Parte II – μ TED-2

Na fabricação do dispositivo utilizado na parte II do trabalho foram utilizados os mesmos materiais descritos para o μ TED-1, além de apresentar diferenças apenas nas etapas 1,6 e 7 do processo de montagem mostrado na Figura 22 em comparação com a Figura 19, sendo elas:

- (1) Alteração na quantidade e comprimento das placas de vidro: junção de placas de vidro com comprimentos de 85 mm (1 placa), 55 mm (7 placas) e 25 mm (1 placa) com o auxílio de fita adesiva transparente, de modo a obter uma diferença de altura (com valor otimizado ao longo dos estudos desta parte) em suas extremidades;
- (6) Adição de dois pedaços de fita adesiva dupla face sobre os cilindros de grafite, para delimitar a largura da zona de detecção;
- (7) Substituição do pedaço de gaze hidrófila por pequenos pedaços de fios de algodão, os quais foram adicionados sobre a região central exposta dos cilindros de grafite.

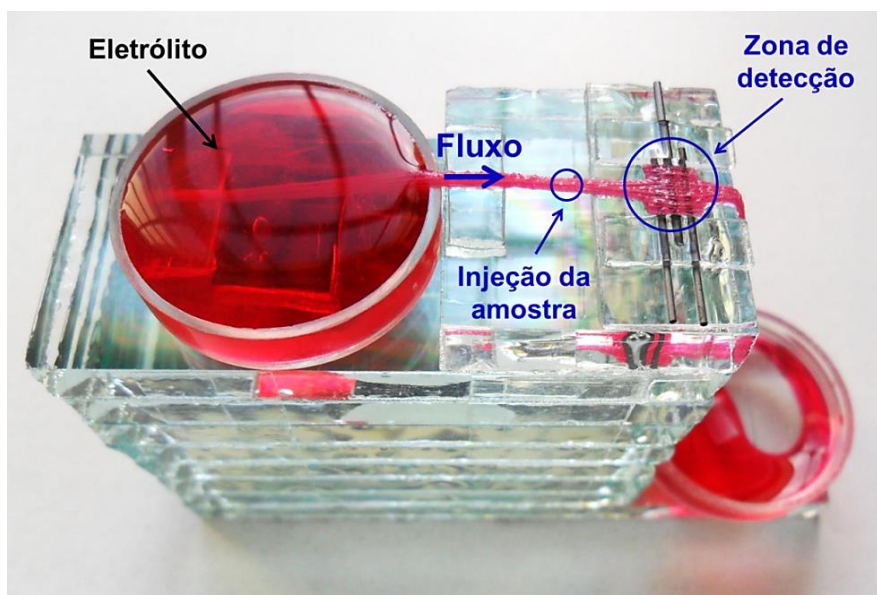
Figura 22. Esquema do processo de construção do μ TED-2, ilustrando os materiais que compõe o dispositivo e as etapas de montagem (representadas pelos números 1 a 7).



FONTE: O autor (2018).

O μ TED-2 pronto para o uso é mostrado na Figura 23, com a indicação das principais regiões que compõe o dispositivo, sendo usado corante alimentar vermelho para melhorar a visualização do caminho percorrido pelo eletrólito de suporte. O μ TED-2 apresentou como dimensões finais um comprimento de 85 mm, altura de 58,5 e largura de 25 mm, com seu funcionamento igual ao descrito para o μ TED-1.

Figura 23. Fotografia do μ TED-2 com as indicações das principais regiões do dispositivo.



FONTE: O autor (2018).

3.2.3 Parte III – μ TED-3

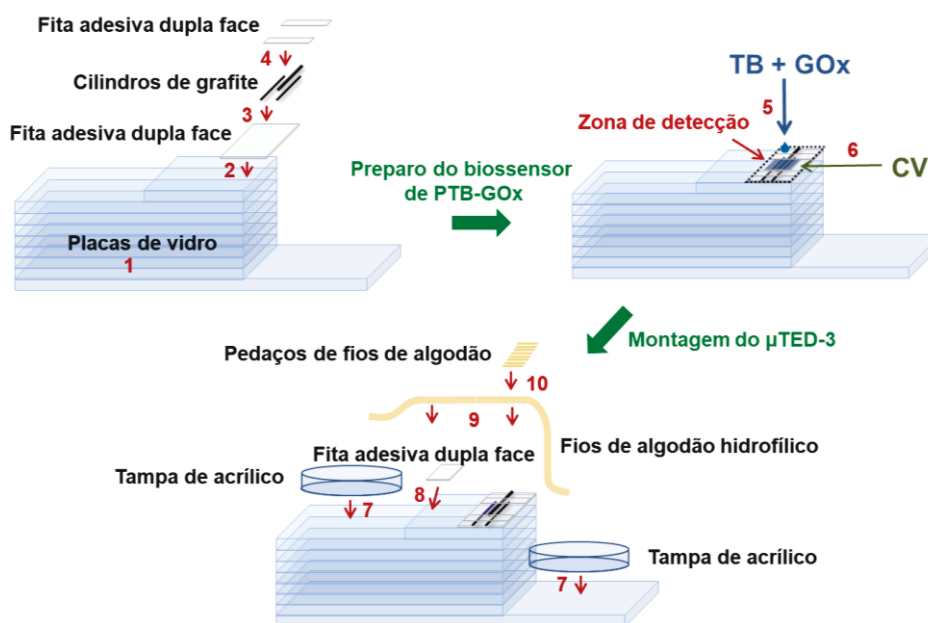
Para a fabricação do μ TED-3, o processo de montagem sofreu alterações devido a construção e integração do biossensor de PTB-GOx ao dispositivo, conforme mostrado esquematicamente na Figura 24. Inicialmente, (1) a base do dispositivo foi montada através da junção de placas de vidro com comprimentos de 85 mm (1 placa), 55 mm (7 placas) e 25 mm (1 placa). Sobre a base foi adicionado um (2) pedaço de fita dupla face, (3) três cilindros de grafite, (dois com diâmetro de 0,5 mm e um com diâmetro de 0,7 mm), com o cilindro de grafite correspondente ao eletrodo de trabalho previamente lixado para a remoção da camada externa de resina presente no material, e por fim, (4) dois pedaços de fita dupla face sobre os grafites para delimitar a área de detecção.

Na sequência, a construção do biossensor de PTB-GOx foi realizada (5) com a adição de 50,0 μ L de solução tampão PB 0,10 mol L⁻¹ contendo azul de O-toluidina (TB) e GOx na zona de detecção, seguida da (6) aplicação de voltametria cíclica (CV) entre -0,60 a 0,70 V vs. grafite a uma velocidade de varredura de 50 mV s⁻¹ para a eletropolimerização da TB e imobilização de GOx na superfície do eletrodo de trabalho. A solução foi então removida e a zona de detecção foi lavada com 3 alíquotas de 50,0 μ L de solução tampão PB para a retirada das espécies não imobilizadas.

Finalmente, a montagem do μ TED-3 foi concluída com a (7) colocação das tampas de acrílico (ambas com capacidade para 4,0 mL de solução), seguida da (8) adição de um pedaço de fita dupla face perto do reservatório de entrada, (9) introdução do canal microfluídico (composto por 9 fios de algodão hidrofílico) ao longo de todo o

dispositivo e (10) adição de pequenos pedaços de fios de algodão sobre a região dos eletrodos.

Figura 24. Processo de montagem do μ TED-3 (representados pelos números 1 a 10), incluindo o preparo de biossensor de PTB-GOx diretamente no dispositivo.



FONTE: O autor (2018).

Após a montagem do μ TED-3 com o biossensor de PTB-GOx, as dimensões do dispositivo permaneceram iguais ao μ TED-2, ou seja, 85 mm de comprimento, 58,5 mm de altura, 25 mm de largura e uma diferença de altura de 52 mm entre o reservatório de entrada e saída. O biossensor de PTB-GOx integrado ao μ TED-3 foi caracterizado por ser seletivo apenas para glicose, devido a incorporação da enzima glicose oxidase, a qual apresentava interação específica por esse analito, com a transferência de elétrons até a superfície do eletrodo sendo feita através da PTB, que atuava como medidor redox (além de fornecer uma matriz estável para a imobilização da GOx), com as análises da glicose sendo feitas em μ FIA com detecção por cronoamperometria.

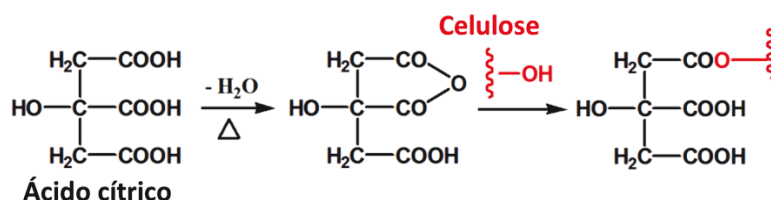
3.2.4 Parte IV – μ TED-4

Para a construção do μ TED-4, os fios de algodão utilizados na montagem do canal microfluídico foram submetidos previamente a um tratamento para a incorporação de grupamentos carboxílicos em sua superfície, seguindo o procedimento descrito por He et al.³⁹⁷ Resumidamente, os fios de algodão foram pesados e misturados a uma solução de ácido cítrico 0,50 mol L⁻¹ na proporção de 1:12 (massa / volume), sendo a mistura levada a uma estufa de secagem e esterilização Biopar (Porto Alegre, RS, Brasil), onde

foi mantida por 24 h a 50 °C, e em seguida, por mais 90 min. a 120 °C. Na sequência, os fios de algodão foram retirados da estufa e após retornarem a temperatura ambiente, foram lavados diversas vezes com água deionizada para a remoção do excesso de ácido cítrico e por fim, secos em temperatura ambiente.

O tratamento dos fios de algodão baseia-se na desidratação inicial do ácido cítrico devido ao aquecimento, com a subsequente reação (através de uma ligação éster) do anidrido gerado com os grupos hidroxila da celulose, promovendo assim a incorporação de grupos carboxilas na estrutura dos fios de algodão,^{397,398} conforme mostrado na Figura 25.

Figura 25. Reações envolvidas na incorporação de grupos carboxílicos aos fios de algodão através de tratamento com ácido cítrico.



FONTE: Adaptado da referência 397.

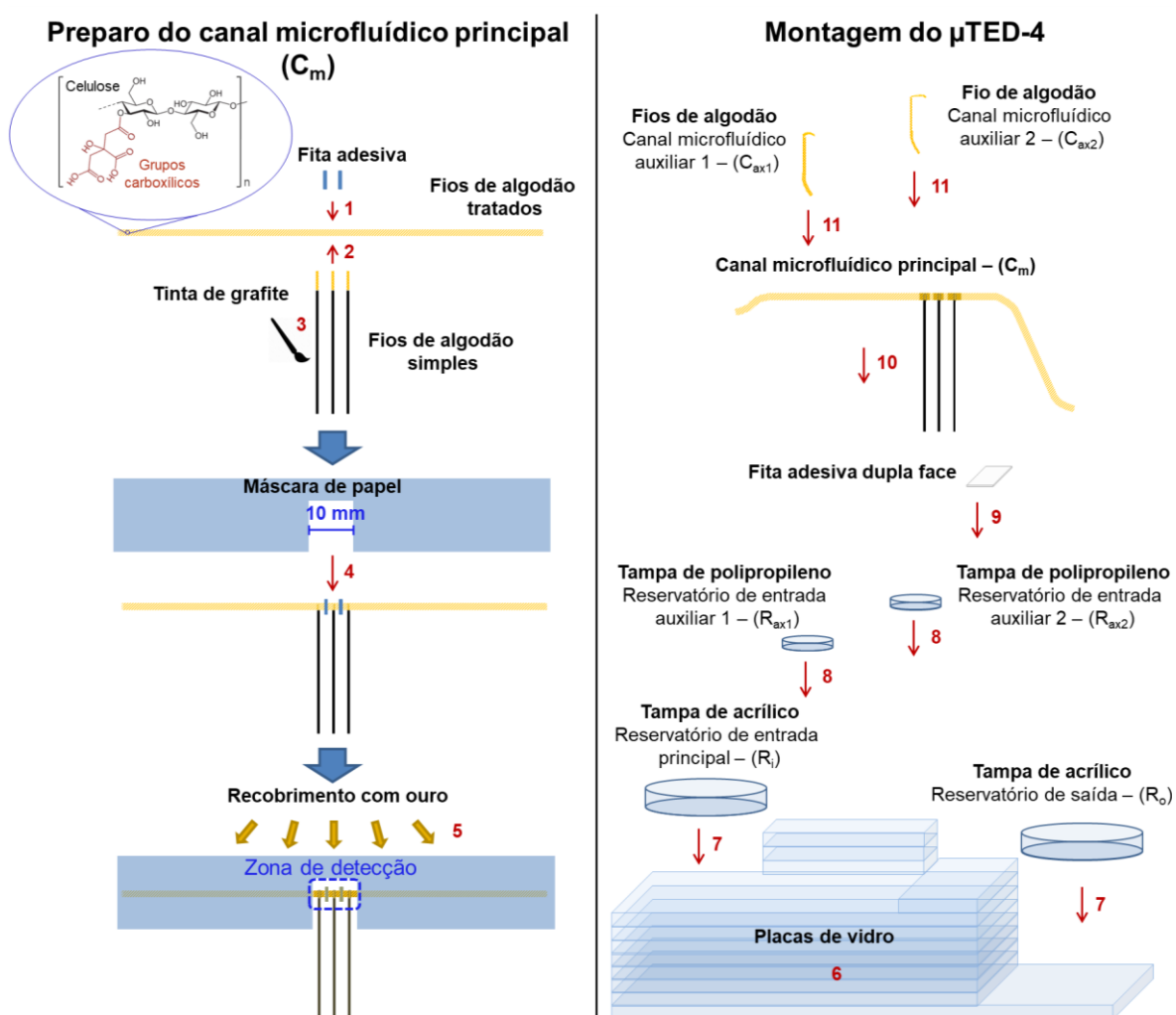
Após o tratamento dos fios de algodão, foi realizada a montagem do μ TED-4 de acordo com as etapas mostradas na Figura 26 e descritas a seguir. Primeiramente, o canal microfluídico principal (C_m) do dispositivo foi preparado através da união de 5 fios de algodão tratados com ácido cítrico (com aproximadamente 150 mm de comprimento), sobre os quais foram (1) adicionados (no centro do canal) 2 pedaços de fita adesiva transparente com aproximadamente 0,75 mm de largura a uma distância de 2,5 mm entre elas, além de (2) três fios de algodão hidrófilos simples, os quais foram amarrados no C_m (entre os pedaços de fita adesiva) a uma distância de 3,25 mm entre eles e posteriormente (3) pintados com tinta de grafite coloidal de modo a permitir a conexão elétrica do canal microfluídico com o potenciostato e também impedir que a solução contida em C_m penetre nesses fios.

A seguir, (4) uma máscara de papel foi adicionada ao longo de toda a área do C_m , exceto na região onde os três fios foram amarrados. A máscara de papel contendo C_m foi então colocada em uma metalizadora Balzers SCD 030 (Balzers Union, Liechtenstein) para a (5) aplicação de uma camada de ouro de aproximadamente 17 nm de espessura através do mecanismo de *sputtering* sobre a região do C_m exposta (com 10 mm de comprimento), formando assim a zona de detecção utilizada nas medidas eletroquímicas.

Posteriormente, foi realizada a integração dos componentes de modo a construir o μ TED-4. A base do dispositivo foi preparada através da (6) união (com auxílio de fita

adesiva transparente) de placas de vidro com comprimentos de 120 mm (1 unidade), 90 mm (6 unidades), 30 mm (1 unidade), 40 mm (2 unidades) e 15 mm (5 unidades). Nos dois extremos da base do dispositivo foram fixadas (7) tampas de acrílico com capacidade de 4,0 mL, funcionando como reservatório de entrada principal (R_i) e reservatório de saída (R_o). Sobre a lateral superior da base (8) foram inseridas 2 tampas de polipropileno com capacidade de 500,0 μ L, as quais foram nomeadas como reservatório de entrada auxiliar 1 (R_{ax1}) e reservatório de entrada auxiliar 2 (R_{ax2}). Na sequência, (9) um pedaço de fita dupla face foi colocado no extremo superior direito da base, seguido da (10) adição de C_m (contendo a zona de detecção), o qual se estendia desde R_i até R_o . Por fim, (11) canais microfluídicos contendo 2 fios de algodão hidrofílico (canal microfluídico auxiliar 1 – C_{ax1}) e 1 fio de algodão hidrofílico (canal microfluídico auxiliar 2 – C_{ax2}) foram adicionados de modo a ligar C_m a R_{ax1} e R_{ax2} , respectivamente.

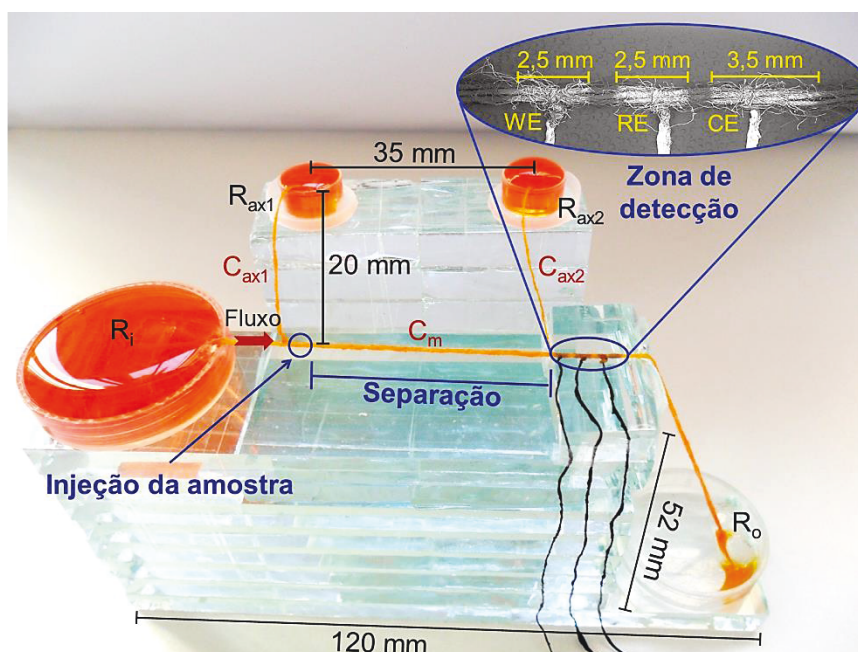
Figura 26. Processo de fabricação do μ TED-4, sendo mostradas as etapas de preparação do canal microfluídico principal e da montagem do dispositivo com a integração de todos os componentes necessários.



FONTE: O autor (2018).

Com o processo de montagem finalizado, o μ TED-4 pronto para o uso é mostrado na Figura 27, juntamente com as principais dimensões, regiões e componentes. Neste dispositivo, que tem o objetivo de realizar separações cromatográficas de compostos integradas a detecção eletroquímica, a injeção da amostra ocorre diretamente em C_m (diâmetro médio de 600,0 μm) na área localizada logo à frente da conexão com o C_{ax1} . Além do transporte do eletrólito de suporte e da amostra, o C_m tem a função de realizar a separação das espécies (na região de separação do canal) devido a incorporação de grupos carboxílicos e também efetuar a detecção eletroquímica dos compostos (previamente separados) através de um sistema de três eletrodos de Au construídos diretamente nos fios de algodão de C_m , os quais formam a zona de detecção mostrada no detalhe da Figura 27.

Figura 27. Fotografia do μ TED-4 com a indicação das principais regiões, dimensões e componentes. Em detalhe, micrografia de MEV da zona de detecção do dispositivo, incluindo o tamanho dos eletrodos de Au. Corante alimentar laranja foi usado para uma melhor visualização dos componentes.



FONTE: O autor (2018).

Os canais microfluídicos auxiliares C_{ax1} e C_{ax2} foram inseridos no dispositivo para permitir a realização de separações cromatográficas com eluição por gradiente, sendo que C_{ax1} (diâmetro médio de 357,0 μm) tem a função de variar a força iônica do eletrólito de suporte (ou fase móvel) que passa pela área de injeção da amostra e pela região de separação, e C_{ax2} (diâmetro médio de 187,0 μm) possui a função de manter constante a

força iônica da solução que chega na zona de detecção, evitando mudanças na linha de base das medidas eletroquímicas que poderiam ocorrer devido as alterações da força iônica das soluções que passam pela região de separação do dispositivo. A junção de C_{ax1} e C_{ax2} a C_m foi feita pelo simples contato entre os fios, sem a necessidade de formar nós para mantê-los conectados.

3.2.5 Parte V – μ TED-5

O μ TED-5 foi projetado para ser um dispositivo microfluídico totalmente portátil, com a capacidade de realizar análises sem o emprego de qualquer equipamento convencional de medida (como os potenciostatos comerciais de bancada). Assim, a construção do μ TED-5 foi dividida em 4 partes: (1) fabricação de um sistema eletrônico miniaturizado de medida responsável pela detecção eletroquímica e transmissão dos dados das análises, (2) desenvolvimento de plataformas para recepção e monitoramento das medidas, (3) construção em impressora 3D da base do dispositivo e dos acessórios necessários para as medidas e (4) integração de todos os componentes do μ TED-5 em uma plataforma totalmente portátil.

3.2.5.1 Sistema eletrônico miniaturizado de medida

O sistema eletrônico miniaturizado foi planejado para realizar medidas cronoamperométricas e permitir a transmissão dos dados das análises via USB ou sem fio (via *bluetooth*), com alimentação elétrica feita por 2 baterias de 9 V. A construção do sistema eletrônico miniaturizado teve início com a criação, simulação e validação dos circuitos eletrônicos através do programa Proteus. Em seguida, tais informações foram transportadas para o programa Eagle, o qual organizou e dimensionou os circuitos e componentes ao tamanho desejado da placa de circuito impresso. Empregando uma fresadora CNC (controle numérico computadorizado), as trilhas eletrônicas foram demarcadas na placa, seguida da montagem e soldagem manual dos componentes. Todas as peças utilizadas para a construção do sistema eletrônico miniaturizado estão listadas na Tabela 2

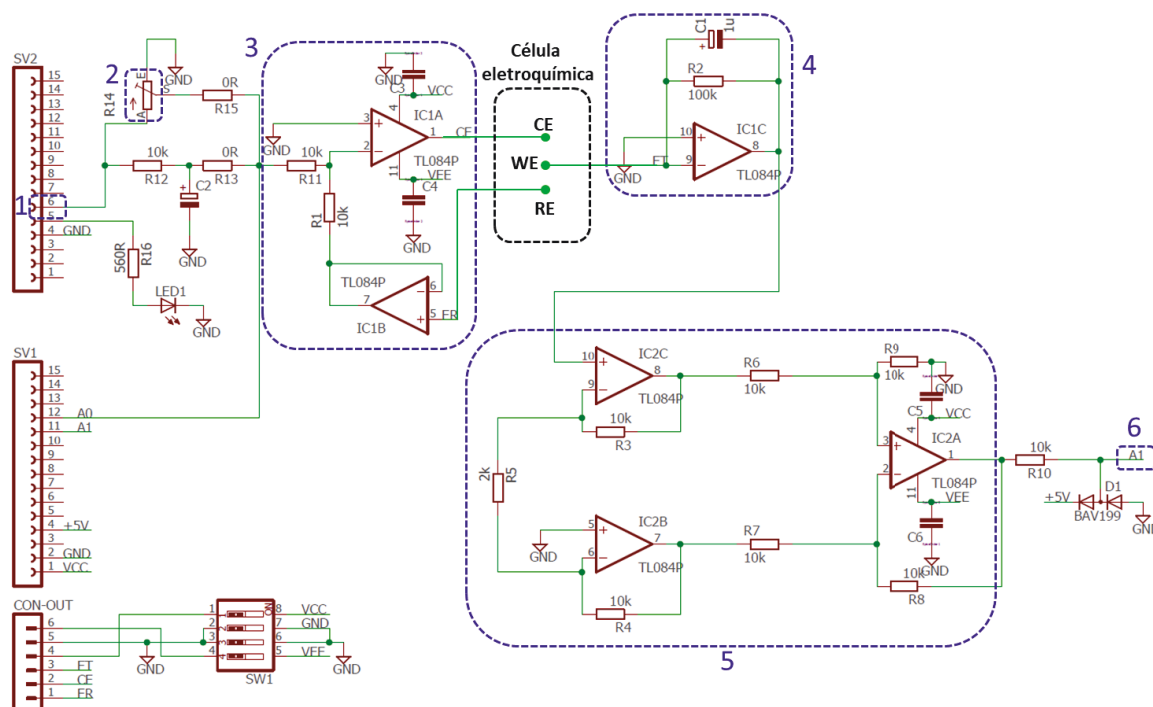
Tabela 2. Componentes utilizados na montagem do sistema eletrônico miniaturizado de medida.

Componente	Quantidade
Placa PCI de fibra e vidro com face simples de cobre	1
Arduino nano – Atmel ATmega328	1
Potenciômetro multivoltas 10 Kohms	1
Amplificador operacional TL084	2
Chave liga/desliga Dip Switch 4 vias 180 graus	1
Led difuso 3 mm	1
Diodo BAV199	1
Resistor 0 Ω	2
Resistor 560 Ω	1
Resistor 2 k Ω	1
Resistor 10 k Ω	8
Resistor 100 k Ω	1
Capacitor 100 nF	4
Capacitor 1 μ F	1
Barra de pinos 1x40 vias	1
Módulo <i>bluetooth</i> HC-05	1

FONTE: O autor (2018).

O circuito utilizado para a construção do sistema eletrônico miniaturizado foi baseado principalmente em amplificadores operacionais (AmpOp) e um microcontrolador, permitindo a realização de análises cronoamperométricas com aplicação de potenciais entre 0 e 5 V e leitura de correntes de até 4,5 μ A. Como mostrado na Figura 28, o funcionamento do sistema tem por base a aplicação de um potencial através do microcontrolador em um dos seus pinos de saída (1), com o ajuste sendo feito por meio de um potenciômetro integrado ao circuito (2), e a compensação do potencial aplicado ocorrendo por um circuito contendo AmpOps na configuração *buffer* ou seguidor de tensão (3). Na sequência, a leitura de corrente na célula eletroquímica é feita por meio de um AmpOp na opção inversor, o qual está associado a um conversor corrente/tensão, e um filtro para tratamento de ruídos em alta frequência (4). Um circuito de instrumentação baseado em AmpOps na configuração seguidor atua para permitir um ganho no sinal medido (5). Por fim é feita a leitura do sinal em uma entrada analógica do microcontrolador (6), que faz o processamento digital do sinal, permitindo a transmissão dos dados via USB ou via módulo *bluetooth*.

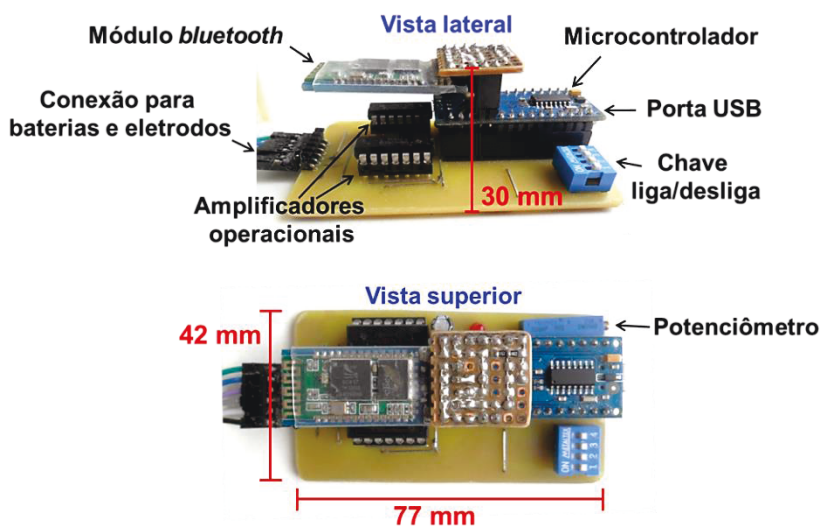
Figura 28. Circuito eletrônico do sistema de medida miniaturizado, com a indicação dos principais componentes.



FONTE: O autor (2018).

O sistema eletrônico miniaturizado pronto para o uso é mostrado na Figura 29, o qual possuía dimensões de 77 mm de comprimento, 42 mm de largura e 30 mm de altura. Além dos componentes listados na Tabela 2 e mostrados na Figura 29, fazem parte do sistema de medida, cabos conectores para os eletrodos e 2 baterias de 9 V.

Figura 29. Sistema eletrônico miniaturizado de medida em vista lateral e superior, com a indicação dos principais componentes e dimensões.



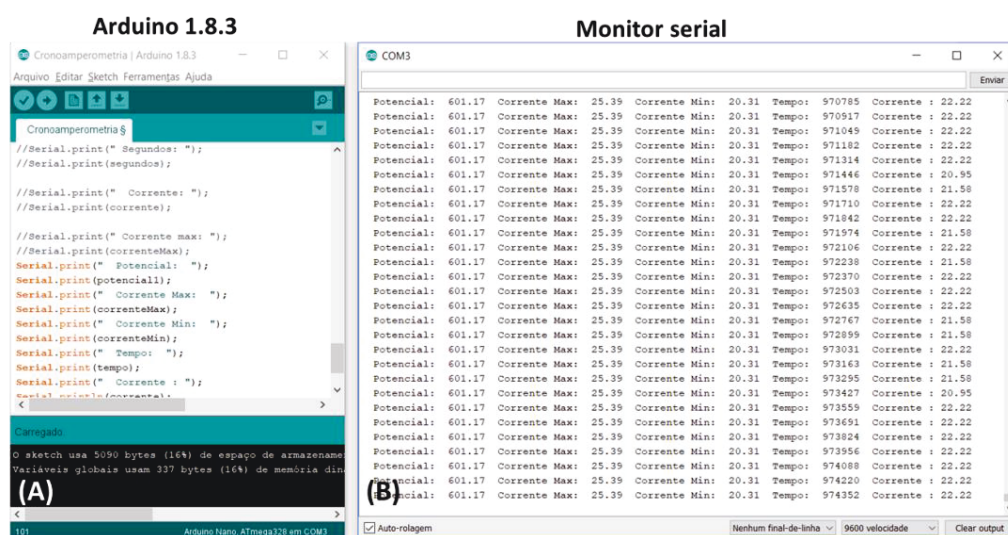
FONTE: O autor (2018).

3.2.5.2 Recepção e gerenciamento das análises

Para o estabelecimento das funções realizadas pelo microcontrolador com relação ao gerenciamento das análises, linhas de comando foram desenvolvidas com base na linguagem C e C++ utilizando o programa Arduino 1.8.3 (Figura 30A), onde foram estabelecidas as configurações para o sinal aplicado (potencial) e para o tratamento digital das respostas lidas pelo sistema, tal como corrente gerada (com a indicação de valores máximos e mínimos) e tempo de análise. Além disso, foi desenvolvido um código de proteção para valores de corrente superior ao limite suportado pelo sistema de medida. Assim, para a realização de tais funções, todos os comandos criados no programa Arduino foram gravados no microcontrolador integrado no sistema eletrônico miniaturizado, o qual possui duas opções de transmissão dos dados, via USB do computador ou por transmissão sem fio para telefones portáteis (*smartphones*) por *bluetooth*.

A recepção dos dados das análises via USB (para computador e *notebook*) foi realizada através da janela Monitor serial (Figura 30B) disponível no programa Arduino 1.8.3, a qual foi configurada (pelas linhas de comando) para mostrar diversas informações da análise em tempo real, sendo elas: potencial aplicado, corrente máxima e mínima (empregadas para a obtenção dos valores de corrente correspondente a cada sinal transiente do analito injetado, os quais podem ser atualizados após cada injeção), tempo de análise e corrente gerada. Ao final da análise, todas as informações da medida mostradas na janela Monitor serial podem ser salvas (em formato .txt) para posterior tratamento dos dados por programas apropriados (como o Origin).

Figura 30. (A) Janela principal do programa Arduino 1.8.3 utilizada para a inserção das linhas de comando e (B) janela Monitor serial empregada para o monitoramento das análises via conexão USB.



FONTE: O autor (2018).

Para o monitoramento por *smartphones* via conexão *bluetooth* das análises realizadas com o sistema eletrônico miniaturizado, um aplicativo foi desenvolvido empregando a plataforma App Inventor, que utiliza a programação em blocos. A tela do aplicativo finalizado é mostrada na Figura 31, a qual apresenta diversas funções, tal como gerenciar a conexão (via *bluetooth*) do *smartphone* ao sistema eletrônico miniaturizado do μ TED-5 através dos botões Conectar e Desconectar, inserir o nome da análise, dar início a medida com o botão Iniciar e acompanhar em tempo real as informações da medida, tais como potencial aplicado, tempo transcorrido, corrente gerada, além dos valores máximos e mínimos de corrente obtidas, os quais podem ser atualizados pelos botões Zera Corrente Máx e Zera Corrente Mín, respectivamente. Por fim, o aplicativo possui a função de encerrar a medida através do botão Finalizar, quando as informações (potencial, tempo e correntes) obtidas durante toda a análise são salvas automaticamente no aparelho (em formato .txt) com o nome previamente inserido.

Figura 31. Tela do aplicativo desenvolvido para o monitoramento e coleta dos dados das análises por conexão *bluetooth* com *smartphone*.

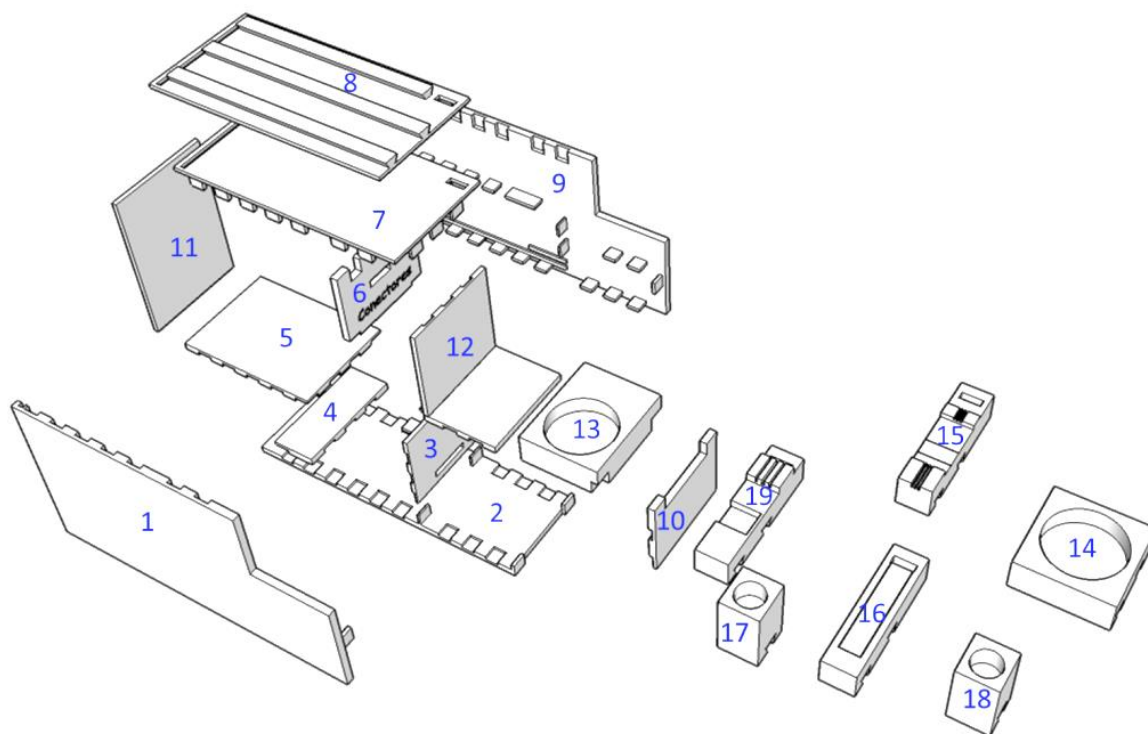
FONTE: O autor (2018).

3.2.5.3 Construção da base e dos acessórios do μ TED-5

A base do dispositivo (responsável pelo armazenamento do sistema eletrônico miniaturizado e das baterias) e todos os acessórios utilizados para as medidas (tais como suporte dos eletrodos e reservatórios das soluções) foram projetados no programa Sketchup, com os modelos 3D das peças necessárias para a construção e funcionamento do μ TED-5 sendo mostradas na Figura 32. Na sequência, os modelos 3D foram importados para o programa Repetier, o qual permite ajustar diversas configurações para a impressão das peças, tais como temperatura de extrusão do

polímero, temperatura da mesa de impressão, preenchimento das peças, tipo e forma do acabamento, entre muitos outros parâmetros. Por fim, com as configurações de impressão estabelecidas, uma impressora 3D Graber i3 GTMaX foi conectada ao programa Repetier, sendo então, as peças do dispositivo construídas com o polímero ABS (acrilonitrilo-butadieno-estireno).

Figura 32. Modelos 3D utilizados para a impressão das peças poliméricas que compõe o μ TED-5.

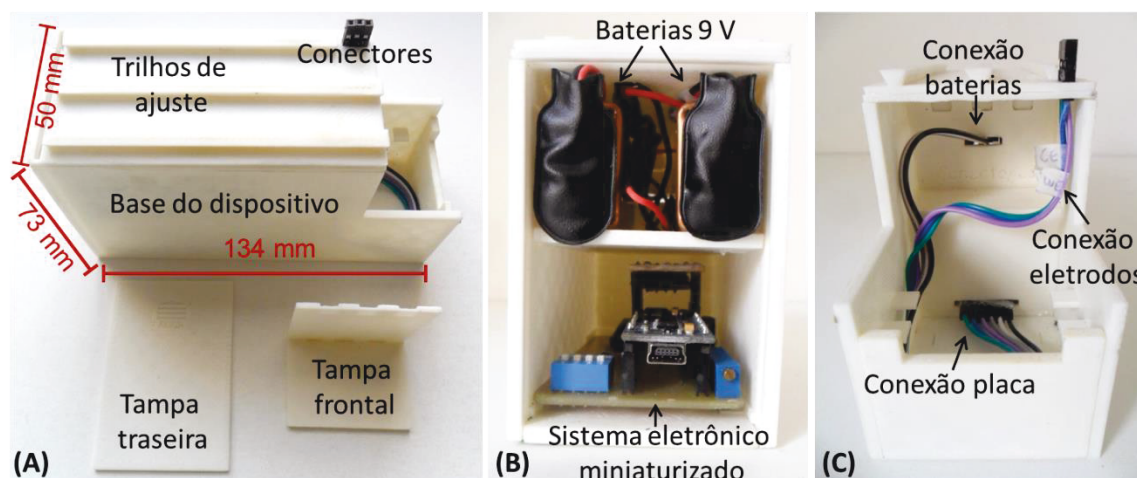


FONTE: O autor (2018).

3.2.5.4 Montagem do μ TED-5

Para a montagem da base do dispositivo, as peças 1 a 10 foram unidas com o auxílio de cola instantânea Super Bonder (Figura 33A). As peças 11 e 12, que correspondem as tampas traseira e frontal, respectivamente, são removíveis de modo a permitir a manutenção do μ TED-5 em caso de necessidade, e por isso, foram apenas encaixadas na base do dispositivo. Na sequência, o sistema eletrônico miniaturizado, as baterias de 9 V e os cabos destinados a conexão destes componentes e dos eletrodos foram inseridos na base no dispositivo, como mostrado na Figura 33B-C. A conexão dos eletrodos com o sistema eletrônico miniaturizado é feita por três conectores posicionados na lateral do dispositivo, conforme indicado nas Figuras 33A e 33C.

Figura 33. Fotografias da (A) base do dispositivo após o processo de montagem, com suas respectivas dimensões. (B) Parte traseira e (C) frontal da base, mostrando os componentes internos do μ TED-5.

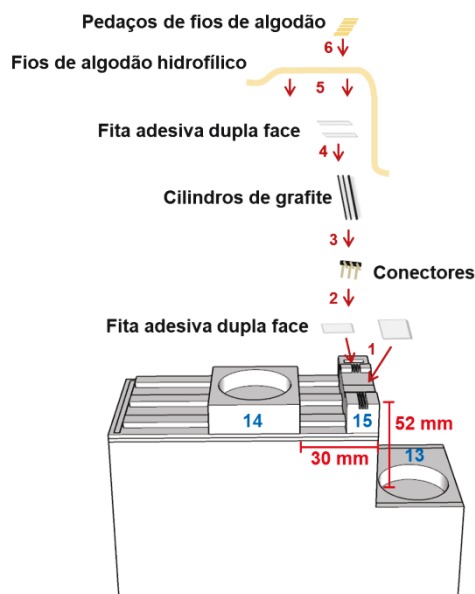


FONTE: O autor (2018).

A parte superior da base possui três trilhos (mostrados na Figura 33), de modo a permitir a troca de peças e a alteração na distância entre elas, possibilitando assim a montagem de três sistemas microfluídicos diferentes, todos contendo canais feitos por fios de algodão, mas sendo empregados tipos diferentes de eletrodos. Assim as etapas de montagem de cada sistema são descritas a seguir.

(1) μ TED-5 com detecção baseada em eletrodos de grafite: a montagem deste sistema (Figura 34) foi iniciada com a inserção das peças 13 (reservatório de saída, com capacidade para 4,0 mL de solução), 14 (reservatório de entrada principal, com capacidade para 4,0 mL de solução) e 15 (suporte para os eletrodos de grafite) na base do dispositivo, mantendo uma diferença de altura de 52 mm entre os reservatórios de entrada e saída. Na sequência, foram adicionados (1) dois pedaços de fita dupla face sobre a peça 15, seguidos da (2) inserção dos conectores dos eletrodos, (3) fixação de três cilindros de grafite e da (4) adição de mais 2 pedaços de fita dupla face sobre os eletrodos (para delimitar o tamanho da zona de detecção). Por fim, (5) o canal microfluídico composto por 9 fios de algodão foi adicionado ao longo de todo o dispositivo (desde o reservatório de entrada até o reservatório de saída), além de (6) pedaços de fios de algodão sobre a região dos grafites.

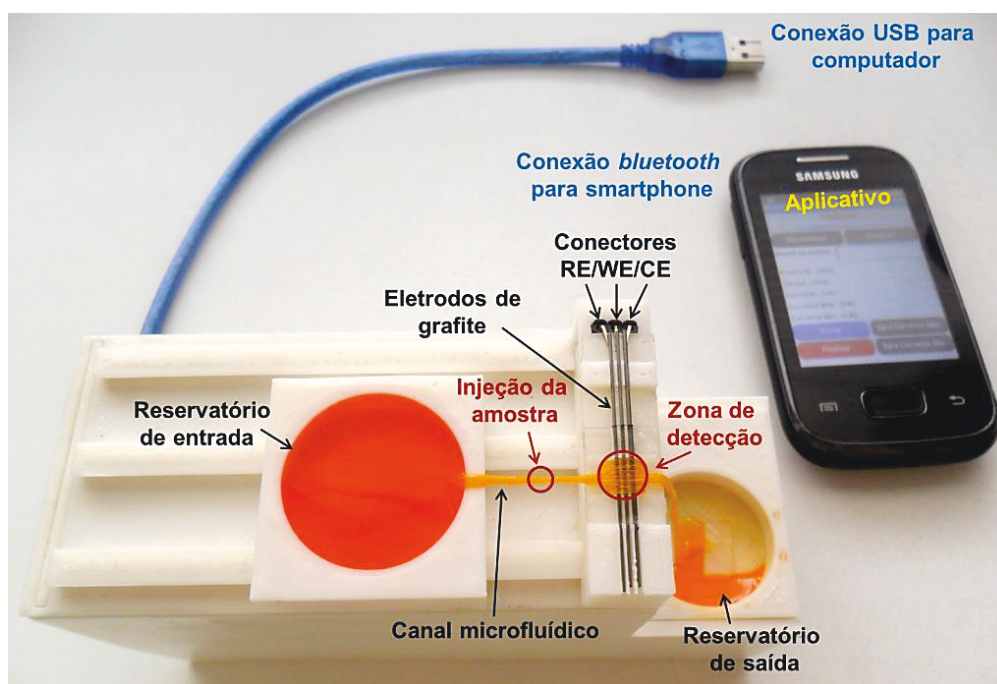
Figura 34. Esquema da montagem do μ TED-5 contendo um sistema de detecção com eletrodos de grafite.



FONTE: O autor (2018).

Assim, com a finalização do processo de montagem, o dispositivo microfluídico completo contendo um sistema de medida eletroquímica baseado em eletrodos de grafite e transmissão dos dados via USB ou sem fio (*bluetooth*) é mostrado na Figura 35.

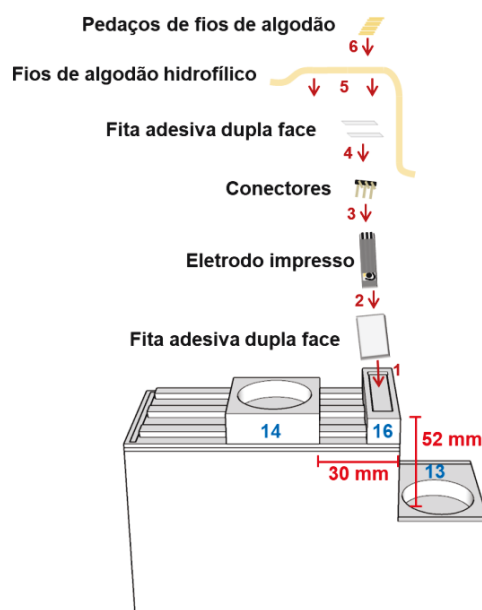
Figura 35. Fotografia do μ TED-5 pronto para o uso empregando eletrodos de grafite para detecção eletroquímica. Corante alimentar laranja foi usado para uma melhor visualização dos componentes do sistema.



FONTE: O autor (2018).

(2) μ TED-5 com detecção baseada em eletrodos de carbono impresso: para a montagem deste sistema, foram inseridos na base do dispositivo os reservatórios de saída e entrada (peças 13 e 14, respectivamente), além do suporte para o eletrodo impresso (peça 16), novamente mantendo uma diferença de altura de 52 mm entre os reservatórios (Figura 36). Sobre a peça 16, foi (1) adicionado de um pedaço de fita dupla face, com a posterior (2) fixação de um eletrodo de carbono impresso nesta região. Na sequência, (3) os conectores dos eletrodos foram inseridos no dispositivo, seguidos pela (4) adição de dois pedaços de fita dupla face nas extremidades da região dos eletrodos (de modo a delimitar a zona de detecção), (5) inserção do canal microfluídico contendo 9 fios de algodão ao longo de todo o dispositivo e, por fim, (6) colocação de pedaços de fios de algodão sobre a região dos eletrodos, de modo a manter uma quantidade mínima de eletrólito sobre eles.

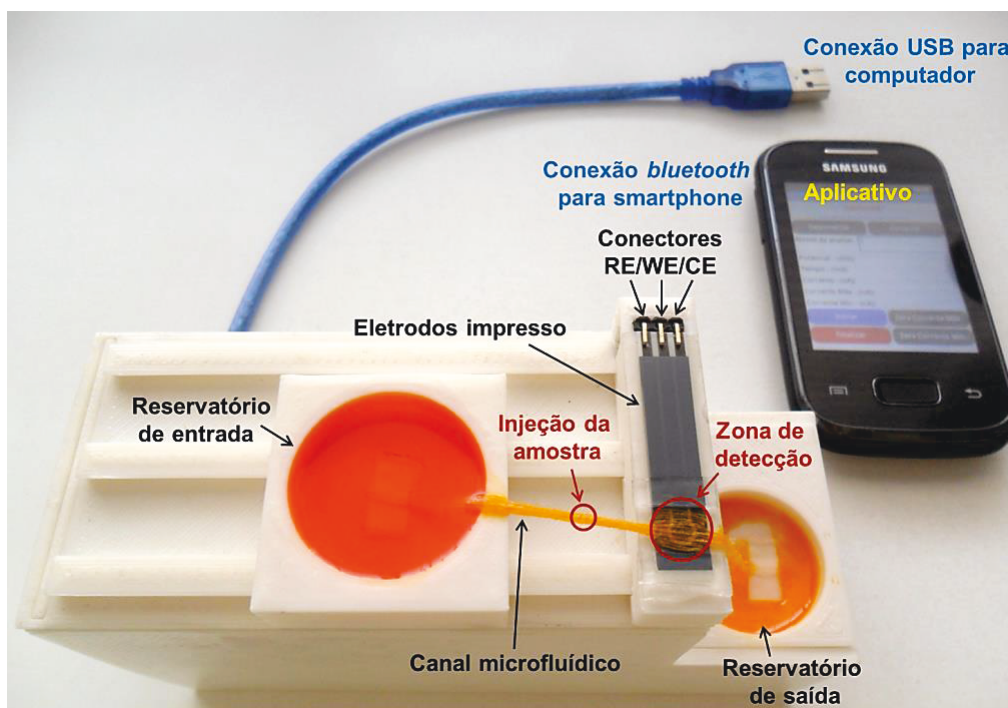
Figura 36. Esquema da montagem do μ TED-5 contendo um sistema de detecção baseado em eletrodo impresso.



FONTE: O autor (2018).

Desta forma, o dispositivo microfluídico completo e pronto para a realização de medidas eletroquímicas utilizando um eletrodo de carbono impresso e transmissão dos dados via USB ou sem fio (*bluetooth*) é mostrado na Figura 37.

Figura 37. Fotografia do μ TED-5 pronto para o uso empregando um eletrodo impresso para a detecção eletroquímica. Corante alimentar laranja foi usado para uma melhor visualização dos componentes do sistema.



FONTE: O autor (2018).

(3) μ TED-5 com detecção baseada em eletrodos de Au: a configuração deste terceiro sistema foi montada de modo a realizar separações cromatográficas prévias a detecção eletroquímica nos eletrodos de Au. Inicialmente, foram adicionadas na base do dispositivo as peças 13 (R_o , com capacidade para 4,0 mL de solução), 14 (R_i , com capacidade para 4,0 mL de solução), 17 (R_{ax1} , com capacidade para 500,0 μ L de solução), 18 (R_{ax2} , com capacidade para 500,0 μ L de solução) e 19 (suporte para os eletrodos de Au). A posição e distância entre os reservatórios principais e auxiliares mostradas na Figura 38, são as mesmas utilizadas nas análises realizadas com o μ TED-4. O tratamento dos fios de algodão com ácido cítrico e a montagem do C_m contendo a região de detecção (composta por eletrodos de Au) também seguiu a mesma metodologia descrita na parte IV do projeto e ilustrada na Figura 26. Desta forma, após inserção das peças 13 a 19 e da construção do C_m , a finalização do processo de montagem do dispositivo inclui simplesmente a (1) adição do C_m a base do μ TED-5 (desde R_i até R_o), (2) inserção de C_{ax1} (contendo dois fios de algodão) e C_{ax2} (contendo um fio de algodão) e (3) fixação dos conectores dos eletrodos.

3.3 CARACTERIZAÇÕES SUPERFICIAIS

Foram realizadas análises superficiais dos fios de algodão nas partes I, II e IV do projeto e no biossensor de PTB-GOx na parte III do trabalho para obtenção de diversas informações e características referentes a estes materiais. Micrografias de MEV com elétrons secundários foram obtidas dos fios de algodão, do eletrodo de grafite e do biossensor de PTB-GOx com o Microscópio Eletrônico de Varredura Tescan VEGA3 LMU (República Tcheca), o qual possui resolução de 3 nm. Todas as imagens foram obtidas com uma aceleração de voltagem de 15 kV. Para as análises em seção transversal, os fios de algodão foram previamente embutidos em parafina e cortados com lâmina de barbear. Em todas as análises, as amostras foram fixadas sobre o porta amostra do equipamento (disco de alumínio de 32 mm de diâmetro) através de uma fita dupla face de cobre, passando em seguida pelo processo de recobrimento com ouro no metalizador Balzers MED010.

Utilizando as micrografias feitas no MEV Tescan e o princípio da estereoscopia, reconstruções 3D foram realizadas com o programa MeX 5.1 (Alicona Imaging GmbH, Áustria) da superfície do eletrodo de grafite e do biossensor de PTB-GOx, sendo obtidas informações relativas a topografia e rugosidade dos mesmos. Além disso, análises elementares e mapeamentos químicos do eletrodo de grafite e do biossensor de PTB-GOx foram realizados por EDS com um Espectroscópio Oxford (Oxford Instruments, Inglaterra), o qual possuía resolução de 125 eV e estava acoplado ao MEV Tescan.

Para a avaliação de possíveis contaminantes nos fios de algodão, micrografias de MEV com elétrons retroespalhados foram obtidas com o Microscópio Eletrônico de Varredura de Alta Resolução (HRSEM) Quanta FEG 450 (FEI Company, Hillsboro, Oregon, USA) com resolução de 1 nm. Além disso, análises químicas elementares (espectros e mapeamentos químicos) foram realizadas por EDS empregando um Espectroscópio EDAX TEAM™ (EDAX Inc, Mahwah, Nova Jersey, USA), o qual estava acoplado ao HRSEM e tinha resolução de 131 eV. Ambas as análises (micrografias de MEV e ensaios de EDS) foram feitas com aceleração de voltagem de 10 kV, em modo baixo vácuo, com uma pressão de 50 Pa.

A análise de microtomografia de raios-X foi realizada com um Microtomógrafo computadorizado Bruker Micro-CT (Bruker Corporation, Kontich, Antuérpia, Bélgica), o qual funcionava integrado ao HRSEM. Os fios de algodão que compõe o canal microfluídico foram analisados uma área de 1,77 mm de comprimento, dividida em 985 camadas. O ensaio foi feito no modo alto vácuo, e para a formação dos raios-X foi utilizado um feixe de elétrons com aceleração de voltagem de 30 kV e um alvo de latão posicionado em 45 graus. Para a análise de microtomografia de raios-X, os fios de

algodão foram fixados verticalmente sobre o porta amostra do equipamento, de modo a permitir que a amostra pudesse girar por 360 graus sem mudar o eixo de rotação.

Caracterizações Raman dos fios de algodão foram feitas com o Microscópio Raman Confocal WITec Alpha300R (Ulm, Baden-Württemberg, Alemanha), com um laser diodo verde (comprimento de onda 532 nm) e com uma potência de 20,0 mW. Os espectros foram obtidos com um tempo de integração de 10 s e 50 acumulações e o mapeamento Raman foi feito em uma área de 30 x 30 μm , sendo a imagem composta por 120 pontos e 120 linhas. Já as análises Raman (espectros e mapeamento) do eletrodo de grafite e do filme de PTB-GOx presente na superfície do biossensor foram realizadas com o mesmo Microscópio Raman, com laser de hélio-néon (comprimento de onda de 633 nm), com uma potência de 1,3 mW. Os espectros foram obtidos com um tempo de integração de 10 s e 10 acumulações e o mapeamento Raman foi feito em uma área de 160 x 160 μm , sendo a imagem composta por 150 pontos e 150 linhas.

Por fim, análises de FTIR dos fios de algodão foram realizadas com o espectrômetro Bomem Michelson MB 100 (Quebec, Canadá) utilizando pastilhas de KBr contendo 1% de fios de algodão previamente macerados em nitrogênio líquido. Os espectros foram obtidos no modo transmitância, com 64 acumulações. Com exceção do FTIR (localizado no Departamento de Química da UFPR), todos os outros equipamentos empregados nas caracterizações superficiais estão disponíveis no Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR.

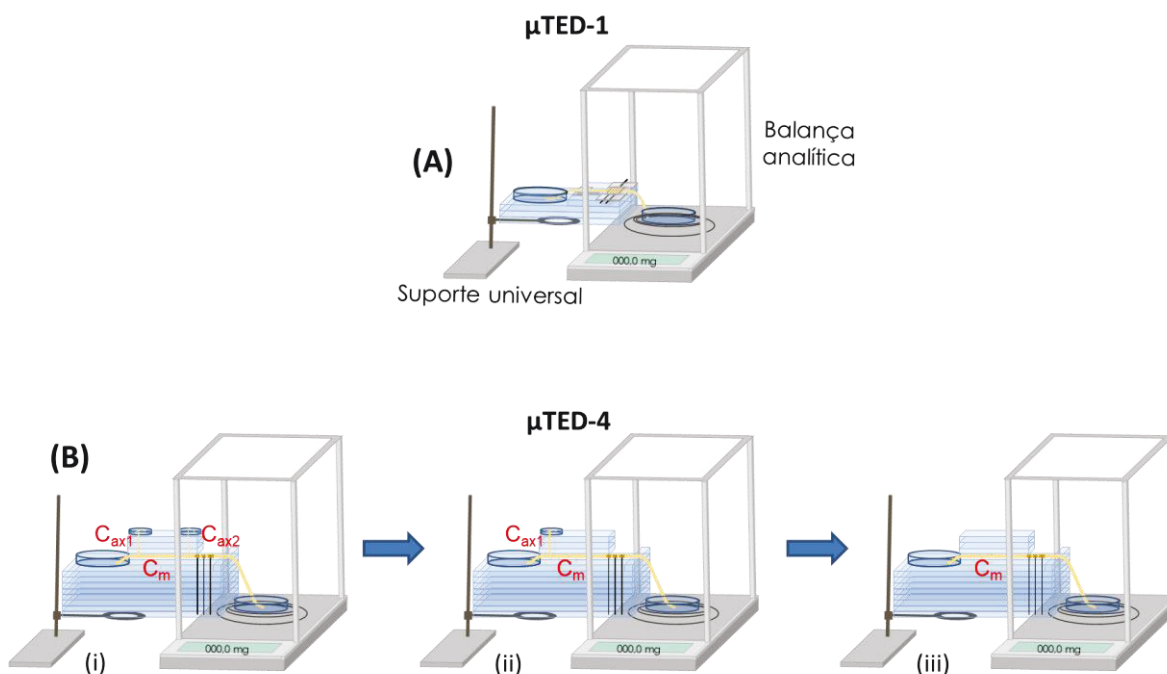
3.3.1 Quantificação dos grupos carboxílicos

A quantidade de grupos carboxílicos incorporados nos fios de algodão tratados foi determinada por titulação complexométrica conforme metodologia descrita por Murphy et al.³⁹² Inicialmente, 500,0 mg de fios de algodão previamente tratados com ácido cítrico foram colocados em 50,0 mL de uma solução de acetato de cálcio 0,10 mol L⁻¹ e deixados sob agitação por 24 horas. Em seguida, alíquotas de 10,0 mL da solução foram transferidas para frascos erlenmeyers, nos quais foi adicionado o indicador murexida e o pH das soluções foi ajustado para 12,0 com uma solução de hidróxido de sódio 0,10 mol L⁻¹, com as soluções adquirindo coloração avermelhada pela formação do complexo Ca-indicador. As soluções foram então tituladas com EDTA 0,10 mol L⁻¹, com o ponto final correspondendo a mudança de cor (de vermelho para violeta) das soluções de íons cálcio presentes nos erlenmeyers devido a liberação do indicador ligado ao metal e formação do complexo Ca-EDTA. Como provas em branco, foram realizadas titulações com EDTA da solução de acetato de cálcio sem entrar em contato com os fios de algodão. As titulações da prova em branco e dos íons cálcio remanescentes foram repetidas 5 vezes.

3.4 AVALIAÇÕES DAS VAZÕES NOS DISPOSITIVOS

As vazões alcançadas pelos canais microfluídicos dos μ TEDs 1, 2 e 4 foram avaliadas por duas metodologias distintas. O primeiro procedimento foi empregado no μ TED-1 e μ TED-4, o qual se baseou na utilização de uma balança analítica Mettler Toledo AL204 (Columbus, OH, USA), com precisão de $\pm 0,1$ mg, onde foi colocado, sobre o prato de pesagem do equipamento, o reservatório de saída dos dispositivos. Com o auxílio de um suporte universal, os μ TEDs foram elevados de modo que os reservatórios de entrada dos dispositivos ficassem a uma diferença de altura fixa do reservatório de saída (situado no prato de pesagem da balança analítica) igual a utilizada nos demais experimentos com o respectivo dispositivo. Para os μ TEDs-1 ($n = 4$), uma única etapa de medida da vazão foi necessária, a qual está representada na Figura 40A. Já para os μ TEDs-4 ($n = 3$), que possuíam três canais microfluídicos, foram realizadas medidas em três etapas (Figura 40B), com os seguintes canais microfluídicos conectados ao dispositivo: (i) $C_m + C_{ax1} + C_{ax2}$; (ii) $C_m + C_{ax1}$ e (iii) apenas C_m , permitindo assim avaliar as vazões individuais dos canais microfluídicos e também o valor total para o dispositivo.

Figura 40. Configurações utilizadas para a avaliação da vazão no (A) μ TED-1 e no (B) μ TED-4.



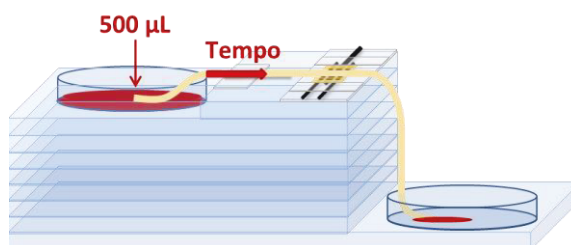
FONTE: O autor (2018).

Para a obtenção das vazões, o volume das soluções que passaram pelos dispositivos microfluídicos foram monitorados (durante 30 minutos) através das variações de massa apresentadas pelos reservatórios de saída, com os estudos sendo iniciados

quando as soluções começavam a sair do canal microfluídico principal. Para uma coleta precisa dos valores e posterior tratamento dos dados, durante todos os experimentos, gravações de vídeo com 30 quadros por segundo das variações das massas mostradas pela balança analítica foram obtidas com uma câmera digital Samsung ES70 (China). Os valores de massa obtidos foram então convertidos em volume considerando a densidade da água a 20°C ($0,998203 \text{ g cm}^{-3}$). As vazões foram então calculadas como a razão entre o volume de solução que deixou os dispositivos e o tempo.

O segundo procedimento foi empregado no $\mu\text{TED-2}$, onde a vazão foi determinada através do monitoramento do tempo necessário para os dispositivos ($n = 5$) transportarem um volume conhecido ($500,0 \text{ }\mu\text{L}$) de eletrólito, o qual foi adicionado no reservatório de entrada (Figura 41). Para uma melhor visualização da solução e obtenção precisa do tempo total de escoamento, corante alimentar vermelho foi misturado ao eletrólito e durante todo o estudo, gravações de vídeo dos dispositivos foram feitas com 30 quadros por segundo com uma câmera digital. A determinação da vazão foi realizada a 20°C e com 60% de umidade relativa do ar, sendo o valor obtido pela relação entre o volume de solução adicionado no reservatório de entrada e tempo necessário para o escoamento deste volume.

Figura 41. Configuração utilizada para a avaliação da vazão no $\mu\text{TED-2}$.



FONTE: O autor (2018).

3.5 MEDIDAS ELETROQUÍMICAS

Todas as medidas eletroquímicas realizadas nos μTEDs das partes I-IV do projeto foram feitas utilizando um potenciostato/galvanostato $\mu\text{Autolab}$ tipo III (Metrohm Autolab, Utrecht, Holanda) empregando os programas GPES 4.9 ou NOVA 1.10, em sistemas de três eletrodos, sendo que para os $\mu\text{TEDs1-3}$ o WE e p-RE foram compostos por cilindros de grafite com 0,5 mm de diâmetro e o CE por um cilindro de grafite de 0,7 mm de diâmetro, com o eletrodo de trabalho sendo utilizado sem nenhuma modificação ($\mu\text{TED-1}$ e $\mu\text{TED-2}$) ou contendo filme de PTB-GOx ($\mu\text{TED-3}$). Para o $\mu\text{TED-4}$, foram utilizados eletrodos de Au (WE, RE e CE) construídos diretamente nos fios de algodão do canal microfluídico. Já no $\mu\text{TED-5}$, foram empregados três sistemas de eletrodos diferentes, os

quais eram baseados em cilindros de grafite, eletrodo de carbono impresso e eletrodos de Au depositados sobre os fios de algodão (assim como no μ TED-4), com as caracterizações eletroquímicas (obtidas por CV) e as análises comparativas feitas com o potenciostato/galvanostato μ Autolab tipo III e todas as outras medidas cronoamperométricas realizadas com o sistema eletrônico miniaturizado desenvolvido e integrado ao dispositivo.

As técnicas eletroquímicas utilizadas ao longo do trabalho e os detalhes de cada procedimento são descritos a seguir:

CV: empregada para a caracterização dos fenômenos eletroquímicos envolvendo os eletrodos e analitos. A CV, a qual se baseia na aplicação de uma varredura de potencial em uma direção e na sequência na direção inversa retornando para o valor inicial de potencial (varredura na forma de um triângulo), foi realizada em todas as partes do projeto. No μ TED-1, μ TED-4 e μ TED-5 (exclusivamente para o sistema contendo eletrodos de Au integrados ao canal microfluídico), as medidas de CV do ACT, DCF, AA, DA e EP foram realizadas com a adição do eletrólito contendo os analitos diretamente no reservatório de entrada dos dispositivos, sendo deixados fluir durante todo o tempo de análise. Já para o μ TED-2, μ TED-3 e μ TED-5 (para os sistemas contendo eletrodos de grafite e impresso), as análises de CV foram realizadas sem o canal microfluídico, com os analitos (NPX, HCZ e UA) ou TB-GOx (eletropolimerização no μ TED-3) sendo inseridos (volume de 50,0 μ L) diretamente na região dos eletrodos.

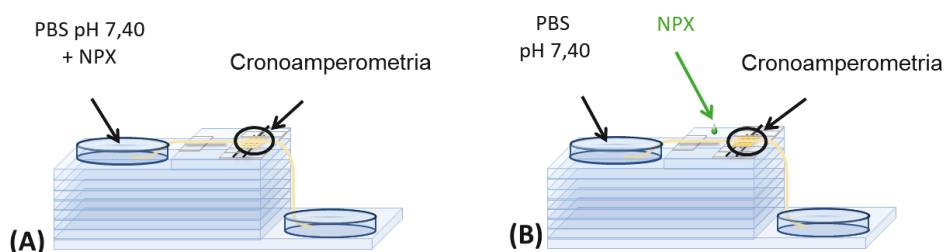
Cronoamperometria e MPA: técnicas empregadas no projeto para a detecção e quantificação dos analitos. A MPA, onde são aplicados pulsos de potencial em função do tempo, foi utilizada no μ TED-1 para a determinação simultânea de ACT e DCF. Para os demais dispositivos (μ TEDs 2-5), foi empregada a cronoamperometria, que foi utilizada para a determinação de NPX, glicose, AA, DA, HCZ, UA e EP, e é baseada na aplicação de um potencial constante e suficiente para a geração de reações redox do analito, com o monitoramento da corrente obtida a partir destas reações. Para ambas as técnicas (cronoamperometria e MPA), as injeções dos analitos (individuais ou simultâneos) foram feitas diretamente no canal microfluídico com o auxílio de uma micropipeta, com volumes e distâncias de injeção (com relação a zona de detecção) dependendo do objetivo da análise e da característica do dispositivo empregado.

3.6 AVALIAÇÃO DA DILUIÇÃO DA AMOSTRA NO CANAL MICROFLUÍDICO

A diluição experimentada pela amostra injetada no canal microfluídico foi realizada no μ TED-2, com a obtenção de duas análises cronoamperométricas com configurações distintas. Na primeira medida, foi adicionado no reservatório de entrada uma solução de

eletrólito de suporte (PB pH 7,4) contendo $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de NPX (Figura 42A), sendo monitorado o aumento da corrente até alcançar um valor estável. Na segunda medida, foi inserido no reservatório de entrada apenas o eletrólito de suporte, sendo o analito ($50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de NPX) injetado com volume de $2,0 \mu\text{L}$ (com uma micropipeta) em tempos regulares diretamente no canal microfluídico (Figura 42B), de modo a obter sinais transientes de corrente. A diluição da amostra no canal microfluídico foi então calculada como a razão entre a corrente gerada para o analito em condições de volume infinito (injeção contínua) e a corrente obtida nas injeções intermitentes do analito com a mesma concentração.

Figura 42. Configurações das análises de NPX no $\mu\text{TED-2}$ por (A) injeção contínua e (B) injeções intermitentes para a avaliação da diluição do NPX no canal.



FONTE: O autor (2018).

3.7 DETERMINAÇÕES EM AMOSTRAS REAIS

3.7.1 Determinação de naproxeno em formulações farmacêuticas

Para a determinação da concentração de NPX presente em formulações farmacêuticas, três amostras comerciais (marcas I, II e III) foram analisadas. Inicialmente, 10 comprimidos de cada marca foram pesados e em seguida macerados em um almofariz com o auxílio de um pistilo. Tendo por base as quantidades de NPX informadas nas embalagens dos produtos e a massa dos comprimidos previamente pesados, foram preparadas soluções de modo a obter uma concentração estimada de NPX de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$. Para isso, $14,0 \text{ mg}$ da marca I, $18,8 \text{ mg}$ da marca II e $19,1 \text{ mg}$ da marca III (todas contendo o excipiente) foram pesadas separadamente e em cada fração foi adicionado $50,0 \text{ mL}$ de PB $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,4. Em seguida, as soluções de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de NPX de cada amostra foram diluídas 10 vezes em PB para obter concentrações finais estimadas do analito de $100,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, provenientes exclusivamente das amostras.

Paralelamente, foi realizado o estudo de adição e recuperação, onde novas alíquotas das soluções de NPX $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ (preparadas anteriormente a partir dos comprimidos macerados) de cada marca foram diluídas 10 vezes em solução de PB

contendo NPX padrão, de modo a obter soluções com concentração final de $200,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ do analito (amostras com adição de padrão), sendo $100,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ provenientes do NPX das amostras e $100,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ do padrão do analito adicionado.

Além disso, soluções de NPX padrão com concentrações entre $1,0 \mu\text{mol}$ e $1,0 \text{mmol L}^{-1}$ também foram preparadas em PB para obtenção de uma curva de calibração, a qual foi usada para o cálculo da concentração do analito nas amostras comerciais (comprimidos sem a adição de NPX padrão) e para obter os valores de recuperação do NPX padrão adicionado nas soluções das amostras comerciais. As análises de determinação de NPX foram feitas por cronoamperometria empregando o $\mu\text{TED-2}$.

3.7.2 Determinação dos níveis de glicose, ácido ascórbico e dopamina em lágrimas

Amostras de lágrimas foram coletadas de 10 voluntários saudáveis de ambos os sexos, na faixa etária entre 20 e 35 anos, sem histórico médico de hiper ou hipoglicemia, após um jejum de 8 horas. Para estimular a produção do fluido de forma simples e sem expor os olhos dos voluntários a qualquer risco, foi utilizada cebola crua macerada, a qual foi colocada próxima dos voluntários por um período de aproximadamente 2 minutos. As lágrimas que desciam dos olhos e ficavam sobre a face foram coletadas com o auxílio de uma pipeta descartável de pasteur, sendo transferidas e armazenadas em tubos plásticos de 1 mL tipo eppendorf.

As determinações dos níveis de glicose nas lágrimas coletadas foram feitas por cronoamperometria usando o biossensor de PTB-GOx integrado ao $\mu\text{TED-3}$, com as amostras sendo analisadas (injeções de $2,0 \mu\text{L}$) da forma como foram coletadas, sem qualquer etapa de purificação. A quantificação dos níveis de glicose presentes na lágrima foi feita pelo método de adição de padrão. Os níveis de glicose no sangue dos 10 voluntários também foram avaliados (no momento da coleta das lágrimas) usando um medidor portátil de glicose (LifeScan Inc., USA). Os dados obtidos com as análises foram utilizados para avaliar uma possível correlação dos níveis de glicose presentes na lágrima e no sangue.

Por fim, para as análises de AA e DA presentes na lágrima foi empregado o $\mu\text{TED-4}$, com a realização de separações cromatográficas dos analitos ao longo do canal microfluídico e detecção por cronamperometria em eletrodos de Au. Assim como feito para a análise de glicose, as amostras de lágrima foram injetadas ($2,0 \mu\text{L}$) no dispositivo sem nenhuma etapa de purificação, com a quantificação dos níveis de AA e DA presentes na lágrima de 3 voluntários sendo feita pelo método de adição de padrão.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante o desenvolvimento do projeto, cinco μ TEDs foram construídos e otimizados, cada um possuindo características e funções específicas e servindo de base para a fabricação e desenvolvimento do dispositivo subsequente. Assim, a seção de resultados e discussão foi dividida em cinco partes, uma para cada μ TED construído, sendo que em cada parte foram utilizados analitos diferentes para estudar e otimizar as características dos dispositivos e avaliar a sua potencialidade analítica.

4.1 PARTE I – μ TED-1

Esta parte compreende a construção do primeiro dispositivo microfluídico do projeto. Sendo assim, os estudos aqui contidos tiveram por objetivo avaliar o processo de fabricação, as características dos materiais que compõe o μ TED e o seu desempenho para a realização de análises em fluxo com detecção eletroquímica. Desta forma, foi utilizado como analitos o ACT e o DCF, e como técnica de detecção foi empregada a MPA, de modo a permitir a determinação simultânea dos compostos.

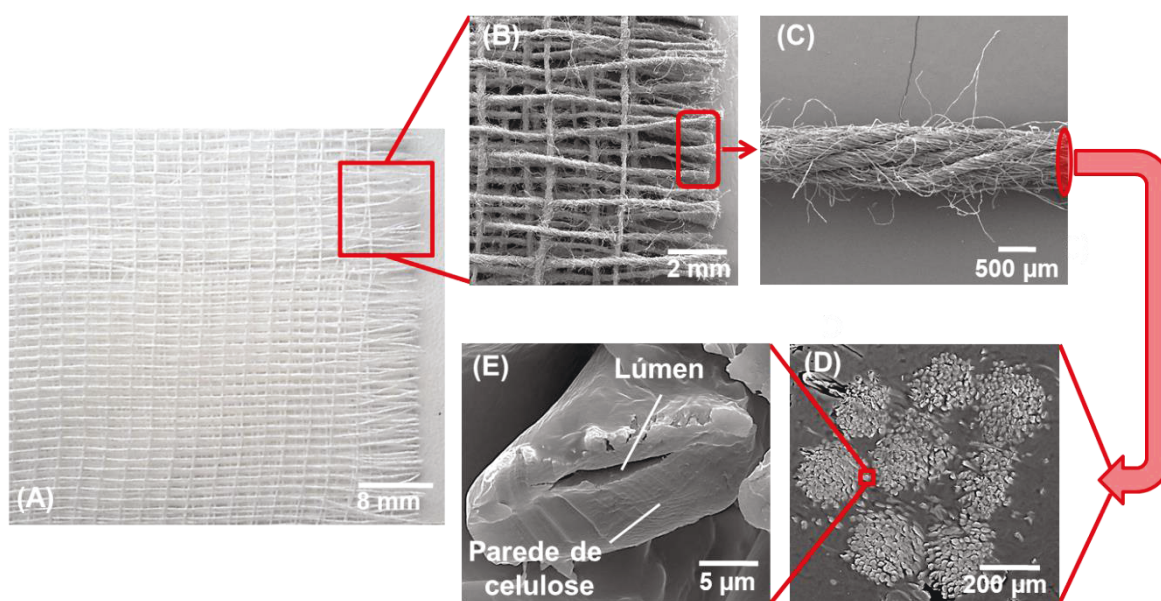
4.1.1 Materiais

Para a construção do μ TED-1, os materiais foram escolhidos levando em consideração o baixo custo e a sua ampla disponibilidade. Como base do dispositivo, foram utilizadas placas de vidro, devido a facilidade de limpeza e rigidez. Porém, diversas outras bases também podem ser empregados, tais como madeira, metais, polímeros, etc. A integração das placas de vidro com os outros componentes do dispositivo microfluídico pôde ser facilmente alcançada utilizando uma fita adesiva dupla face de forte fixação (Fixa forte transparente, 3M, Sumaré, SP), a qual era composta por massa de adesivo acrílico transparente e possuía dentre outras características uma ótima flexibilidade e alta aderência superficial. Os eletrodos foram constituídos por cilindros de grafite (0,5 e 0,7 mm de diâmetro) utilizados em lapiseira, os quais permitiam uma fácil acomodação no dispositivo proposto e possuíam características eletroquímicas importantes, tais como pequena resistividade e baixa reatividade química e eletroquímica.^{214,399} Como reservatórios de entrada e saída das soluções, foram utilizadas tampas de acrílico, devido a sua transparência e fácil limpeza. Além do acrílico, qualquer material inerte pode ser empregado como reservatórios das soluções no dispositivo.

Gazes hidrófilas de algodão (Figuras 43A e 43B) foram usadas para delimitar o tamanho da zona de detecção e seus fios foram empregados como canal microfluídico

para o transporte das soluções. Inicialmente, não foi necessário a realização de nenhum tratamento para a utilização da gaze e dos fios de algodão, visto que durante o processo de fabricação deste material, a camada de cera que naturalmente recobre as fibras de algodão foi removida, tornando-a mais polar e hidrofílica, devido à exposição da estrutura fibrosa da celulose, rica em grupos $-OH$ (hidroxilas).^{127,40} Desta forma, o canal microfluídico do μ TED-1 foi construído por 8 fios hidrofílicos de algodão unidos na forma de espiral (Figuras 43C e 43D), sendo que o canal apresentou um diâmetro aproximado de $800 \pm 12 \mu m$ e era constituído por 1037 ± 92 fibras, valor obtido através da contagem das fibras em 5 imagens de MEV feitas em seção transversal. Por fim, cada fibra de algodão apresentou um diâmetro aproximado de $18 \pm 2 \mu m$ e era composta por um canal central chamado de lúmen e circundado por uma parede de celulose (Figura 43E).

Figura 43. (A) Fotografia da gaze hidrófila de algodão utilizada na construção do μ TED-1; Conjunto de micrografias representativas de MEV: (B) pedaço da gaze hidrófila, (C) fios de algodão que compõe o canal microfluídico, seção transversal do (D) canal microfluídico e (E) de uma fibra de algodão.



FONTE: O autor (2018).

4.1.2 Avaliação do custo do dispositivo

Para melhorar a acessibilidade à tecnologia dos dispositivos microfluídicos, estes devem apresentar, além de um desempenho analítico desejável, um baixo custo de fabricação. Para isso, deve-se empregar processos de construção simples e utilizar materiais baratos e acessíveis.

Com base nos valores de aquisição dos materiais utilizados para a montagem do μ TED-1, o custo estimado de cada dispositivo foi de 1,92 reais (Tabela 3), valor este comparável com os dispositivos descartáveis de fluxo lateral, os quais possuem custos de fabricação entre 0,40 – 12,00 reais por teste.¹¹³ No cálculo do custo de cada μ TED-1, não foram incluídos os valores dos equipamentos utilizados nas medidas eletroquímicas, tal como potenciostato e computador. Além disso, o custo de cada μ TED-1 pode ser reduzido com o emprego de uma base mais barata, visto que as placas de vidro utilizadas correspondem por 52% do custo total. Por fim, diferentemente dos dispositivos descartáveis, o μ TED-1 pode ser utilizado continuamente por vários dias, necessitando apenas de um processo de verificação e calibração durante longos intervalos de análise.

Tabela 3. Custo estimado dos materiais empregados na fabricação do μ TED-1.

Material	Quantidade usada em cada dispositivo	Custo por dispositivo (reais)
Placa de vidro	300 mm	1,00
Fita adesiva dupla face	50 mm	0,28
Cilindros de grafite	3 pedaços (1 ^{1/2} grafite)	0,24
Gaze hidrófila de algodão	1 pedaço (60 mm ²)	0,04
Fios hidrofílicos de algodão	110 mm	0,01
Tampas de acrílico	2 unidades	0,35
Total		1,92

FONTE: O autor (2018).

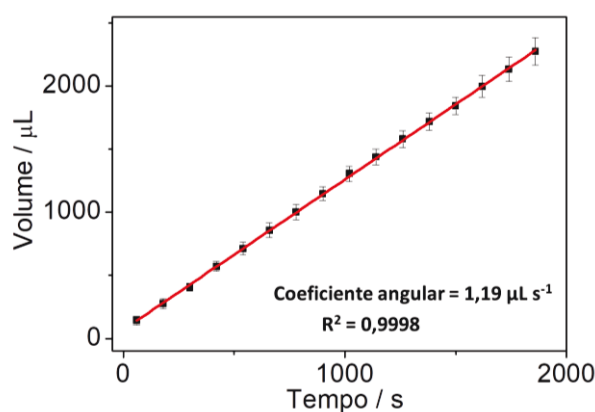
4.1.3 Determinação da vazão

Um dispositivo microfluídico desenvolvido para a realização de ensaios analíticos por análise em fluxo deve apresentar uma vazão significativa e constante para evitar inconsistências entre as medidas, as quais podem ser geradas por problemas inerentes ao transporte de eletrólitos e analitos ao longo dos canais microfluídicos.

Para a investigação da vazão no μ TED-1, o aumento da massa de solução presente no reservatório de saída foi monitorado em função do tempo. Como mostrado na Figura 44, o volume (após a conversão dos valores de massa) de solução contida no reservatório de saída aumentou linearmente com o tempo, indicando um fluxo contínuo e livre de oscilações significantes ao longo dos 30 minutos de avaliação ($R^2 = 0,9998$), apenas com um pequeno aumento nas barras de desvios para tempos maiores, comparando os quatro dispositivos avaliados. Com o cálculo do coeficiente angular da relação entre o volume de solução que passou pelo dispositivo e o tempo (Figura 44), foi obtida uma vazão de 1,19 $\mu\text{L s}^{-1}$. Em comparação com as vazões relatadas em outros estudos (entre 0,04 e 0,36 $\mu\text{L s}^{-1}$) nos quais também foram utilizados fios para realizar o

transporte das soluções,^{139,159,401} o μ TED-1 apresentou um valor superior, explicada em grande parte pela união da capilaridade, produzida pelos fios de algodão hidrofílico que compõe o canal microfluídico, e a força gravitacional, a qual atua no dispositivo devido a diferença de altura (26 mm) entre os reservatórios de entrada e saída.

Figura 44. Relação entre o volume de solução que passa pelo μ TED-1 e o tempo. As barras verticais representam o desvio padrão para quatro dispositivos avaliados. O coeficiente angular representa a vazão e o R^2 (coeficiente de correlação linear), indica a linearidade nos dados obtidos.



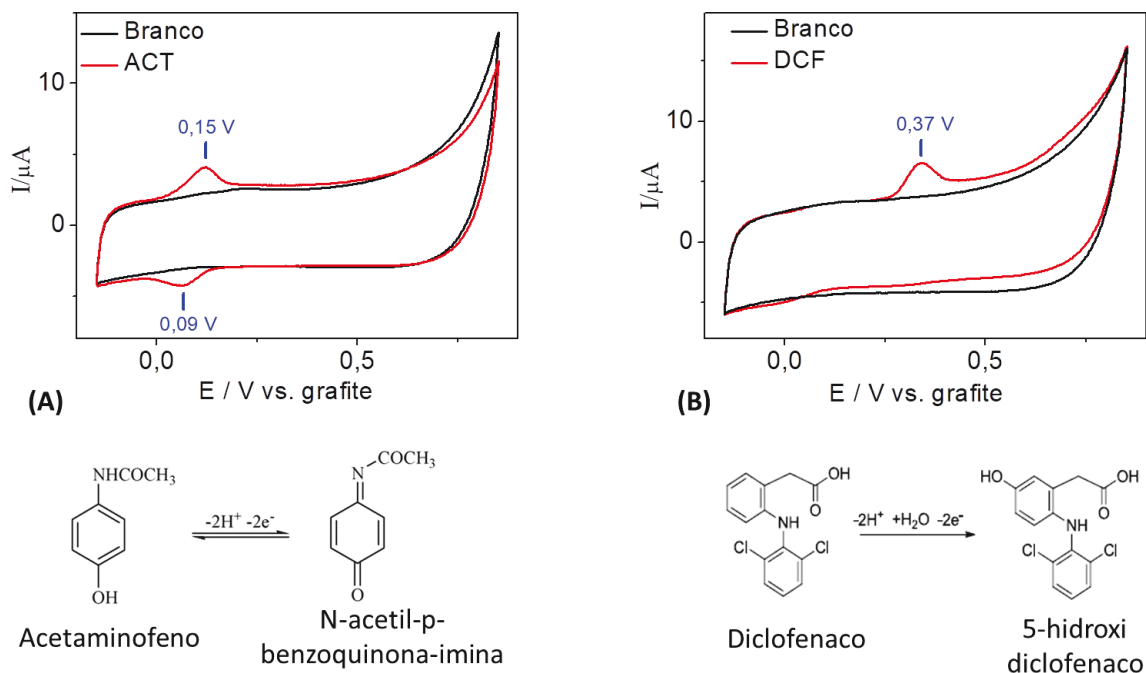
FONTE: O autor (2018).

Com relação ao efeito da evaporação das soluções que passaram pelo dispositivo, normalmente são relatadas na literatura taxas de evaporação de poucos nL s^{-1} ou menores,¹⁵³ o que comparado com a vazão observada no μ TED-1 ($1,19 \mu\text{L s}^{-1}$), não apresentou uma influência significativa, ficando comprovado pela linearidade obtida na relação volume x tempo no estudo da vazão.

4.1.4 Comportamento eletroquímico do acetaminofeno e diclofenaco

As caracterizações eletroquímicas foram realizadas para estudar o comportamento das espécies de interesse (ACT e DCF) no μ TED-1, principalmente no que diz respeito aos valores de potencial dos seus processos de oxidação e redução, visando uma posterior determinação simultânea destas espécies por MPA. Assim, inicialmente, CVs foram obtidos em PB $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,4 no dispositivo antes (prova em branco) e após a adição de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de ACT ou $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de DCF no reservatório de entrada (Figura 45).

Figura 45. CVs obtidos com o μ TED-1 em PB 0,10 mol L⁻¹ pH 7,4 antes (linha preta) e após a adição de (A) ACT ou (B) DCF (linhas vermelhas). As reações eletroquímicas correspondentes aos analitos também são mostradas. Eletrólito de suporte: PB 0,10 mol L⁻¹ pH 7,4; velocidade de varredura: 100 mV s⁻¹.

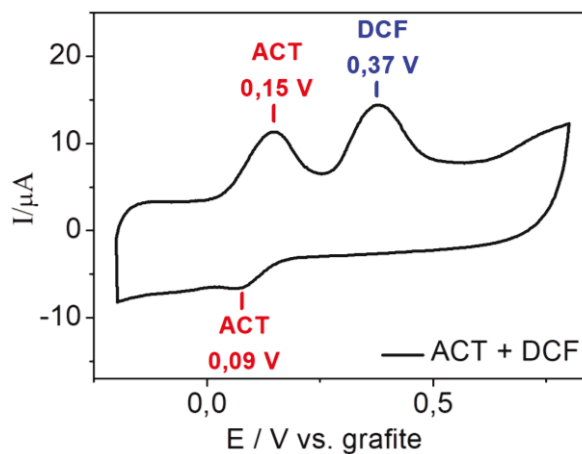


FONTE: O autor (2018). Reações adaptadas das referências 405 e 407.

No voltamograma obtido apenas com o eletrólito de suporte (prova em branco), nenhum processo faradaico foi observado, indicando a ausência de contaminantes nos materiais que compõe o μ TED-1. Para o ACT, o CV apresentou um processo envolvendo $2e^-$ e $2H^+$ com um pico de oxidação em 0,15 V vs. grafite, atribuído à transformação do acetaminofeno em N-acetil-p-benzoquinona-imina e um pico de redução em 0,09 V vs. grafite, correspondente à regeneração do acetaminofeno.⁴⁰²⁻⁴⁰⁵ Com relação ao DCF, foi observado no CV correspondente a 1,0 mmol L⁻¹ do analito apenas um pico de oxidação em 0,37 V vs. grafite, o qual corresponde a formação do 5-hidroxi diclofenaco pela perda de $2e^-$ e $2H^+$,^{257,46,407} mostrando uma diferença de 0,22 V nos potenciais de oxidação do ACT e DCF.

Assim, para a confirmação da diferença dos potenciais de oxidação observados nas análises individuais das espécies (diferença de 0,22 V) e da possibilidade na determinação simultânea dos analitos, uma análise de CV foi obtida para uma solução contendo a mistura de 2,50 mmol L⁻¹ de ACT e 2,50 mmol L⁻¹ de DCF. Foi observada uma separação completa nos processos de oxidação das espécies, os quais ocorreram nos mesmos potenciais observados nas análises individuais (0,15 V para o ACT e 0,37 V para o DCF) (Figura 46), confirmando assim a diferença de 0,22 V entre os processos e indicando a possibilidade da determinação simultânea das espécies por MPA.

Figura 46. CV obtido no μ TED-1 para uma mistura de $2,50 \text{ mmol L}^{-1}$ de ACT e $2,50 \text{ mmol L}^{-1}$ de DCF. Eletrólito de suporte: PB $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,4; velocidade de varredura: 100 mV s^{-1} .

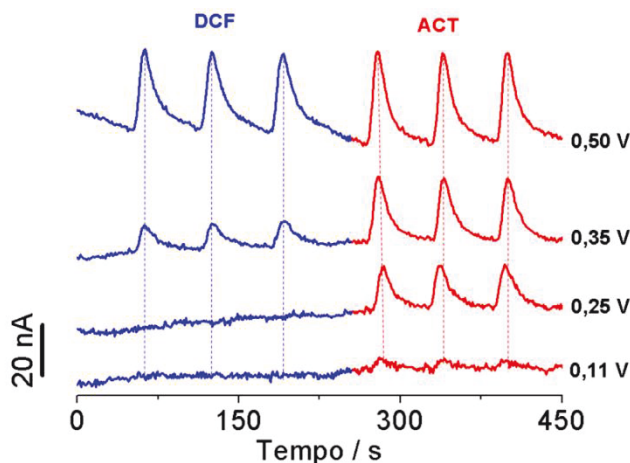


FONTE: O autor (2018).

Paralelamente, foi obtido um CV da mistura dos analitos empregando um eletrodo de referência de Ag/AgCl, sendo observado um deslocamento anódico de $0,43 \text{ V}$ dos processos redox do ACT e DCF com relação ao eletrodo de pseudo referência de grafite empregado nas análises do μ TED-1.

Antes da realização das análises por MPA, foi necessário selecionar os melhores valores de potencial de oxidação para cada espécie, os quais serão empregados nos pulsos de potencial da MPA, de modo a permitir uma separação adequada entre os sinais do ACT e DCF. Desta forma, medidas cronoamperométricas foram realizadas em soluções contendo $20,0 \text{ μmol L}^{-1}$ de DCF + $20,0 \text{ μmol L}^{-1}$ de ACT nos potenciais de $0,11$; $0,25$; $0,35$ e $0,50 \text{ V vs. grafite}$ (Figura 47).

Figura 47. Cronoamperogramas obtidos em diferentes potenciais como μ TED-1 para a injeção de DCF e ACT. Eletrólito de suporte: PB $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,4; volume de injeção: $2,0 \text{ μL}$.



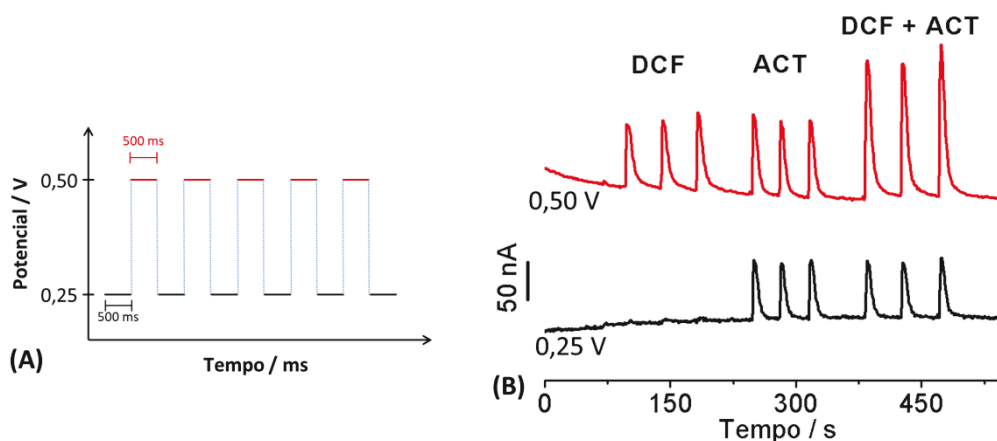
FONTE: O autor (2018).

Em 0,11 V, o qual corresponde ao potencial de pico à meia altura para o ACT, de acordo com o CV da Figura 45A, foi observado o início do processo de oxidação deste analito, sendo obtida uma intensidade de sinal maior em 0,25 V para o ACT e nenhuma resposta em ambos os potenciais para o DCF. Já em 0,35 V, além da oxidação do ACT, foi possível obter uma baixa resposta para o DCF, correspondente a uma pequena oxidação desta espécie, a qual apresentou valores de corrente significativos em 0,50 V. Assim, para a determinação simultânea de ACT e DCF por MPA, foram selecionados pulsos de potencial anódicos de 0,25 V (500 ms) para a oxidação apenas do ACT e de 0,50 V (500 ms) para a oxidação de ambas as espécies.

4.1.5 Determinação de acetaminofeno e diclofenaco por amperometria de múltiplos pulsos

Para comprovar a eficácia do μ TED-1 na determinação simultânea de espécies com diferentes potenciais redox, foi realizada uma análise por MPA com aplicação de pulsos de potencial de 0,25 e 0,50 V (ambos com 500 ms de duração) (Figura 48A) para injeções ($n = 3$) de soluções contendo (i) apenas $40,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de DCF, (ii) apenas $40,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de ACT e (iii) a mistura de $40,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de DCF + $40,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de ACT (Figura 48B).

Figura 48. (A) Forma de aplicação dos pulsos de potencial para a medida de MPA e (B) sinais transientes obtidos para a injeção individual de DCF e ACT e para a mistura dos analitos. Eletrólito de suporte: PB: $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,4; volume de injeção: $2,0 \mu\text{L}$.



FONTE: O autor (2018).

Observando as intensidades dos sinais transientes obtidos em 0,25 V, apenas o ACT foi oxidado, tanto na injeção individual quanto na mistura com DCF, enquanto em 0,50 V, ambas as espécies sofreram processo de oxidação. Como a proposta da

metodologia tinha por base a determinação simultânea de ACT e DCF, foi necessário obter o valor de corrente correspondente ao DCF a partir das intensidades de sinal observados para a mistura das espécies e não na injeção individual do analito. Entretanto, através da simples subtração das correntes geradas para a mistura de ACT e DCF nos dois potenciais (0,25 e 0,50 V), não foi possível obter o valor correspondente ao DCF, visto que as respostas eletroquímicas observadas para o ACT não foram as mesmas em ambos os potenciais (82,6 nA em 0,25 V e 111,0 nA em 0,50 V). Para contornar este problema, foi aplicado um fator de correção (CF), estratégia que normalmente é utilizada em análises por MPA,^{217,48-410} o qual corresponde a obtenção de uma razão entre os valores de corrente em maior e menor potencial da espécie mais facilmente oxidada. Desta forma, o valor de CF foi então utilizado para o cálculo da corrente correspondente a outra espécie presente na mistura. Assim, um CF foi calculado a partir das respostas obtidas para o ACT nos potenciais de 0,25 e 0,50 V:

$$CF = i_{\text{ACT em 0,50 V}} / i_{\text{ACT em 0,25 V}} \quad (3)$$

e então, a corrente correspondente ao DCF em 0,50 V para a medida realizada da mistura das espécies, foi obtida da seguinte forma:

$$i_{\text{DCF}} = i_{\text{mistura em 0,50 V}} - (CF \times i_{\text{mistura em 0,25 V}}) \quad (4)$$

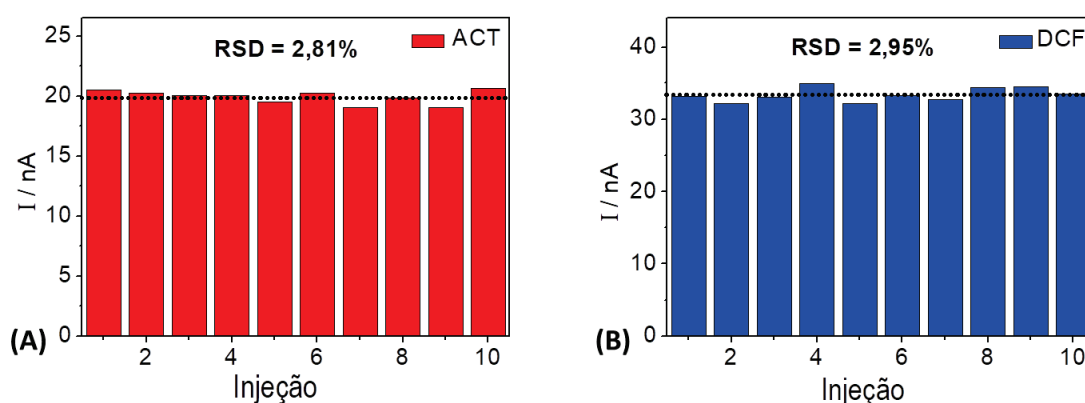
Portanto, o CF calculado para a análise foi de 1,34 e a média dos valores de corrente encontrados para o DCF foi de 94,7 nA, o qual correspondeu a um desvio de apenas 0,94% da resposta obtida na análise individual de DCF (95,6 nA) (realizada apenas para efeito de comparação). Além disso, para confirmar a viabilidade na utilização do CF para diferentes concentrações dos analitos, uma análise de MPA foi realizada em 0,25 e 0,50 V para soluções contendo apenas ACT entre 10,0 e 320,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, as quais apresentaram respostas lineares em ambos os potenciais, com a obtenção de um mesmo valor de CF para toda a faixa de concentração avaliada. Por fim, é recomendado obter o CF no início de cada processo de calibração devido a variações que podem ocorrer em análises realizadas em diferentes dias ou com diferentes dispositivos.⁴¹¹

4.1.6 Desempenho analítico do $\mu\text{TED-1}$ para a determinação de acetaminofeno e diclofenaco

Inicialmente, foi avaliada a estabilidade nas medidas feitas com o dispositivo microfluídico, característica fundamental para que este possa ser utilizado em análises

em microfluxo. Diversos parâmetros podem afetar a repetibilidade nas respostas do μ TED-1, tal como, oscilações no fluxo, variações nas injeções da amostra e retenção do analito na zona de detecção. Desta forma, a estabilidade das medidas realizadas com o μ TED-1 por MPA foram avaliadas através da injeção sucessiva ($n = 10$) de uma solução contendo uma mistura de $20,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de DCF + $20,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de ACT, como mostrado na Figura 49.

Figura 49. Valores de corrente e desvios obtidos com o μ TED-1 por MPA para o (A) ACT e o (B) DCF. A linha pontilhada horizontal indica o valor médio das correntes obtidas. Pulsos de potencial aplicados: $0,25 \text{ V} / 500 \text{ ms}$ e $0,50 \text{ V} / 500 \text{ ms}$; eletrólito de suporte: PB $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,4; volume de injeção: $2,0 \mu\text{L}$.

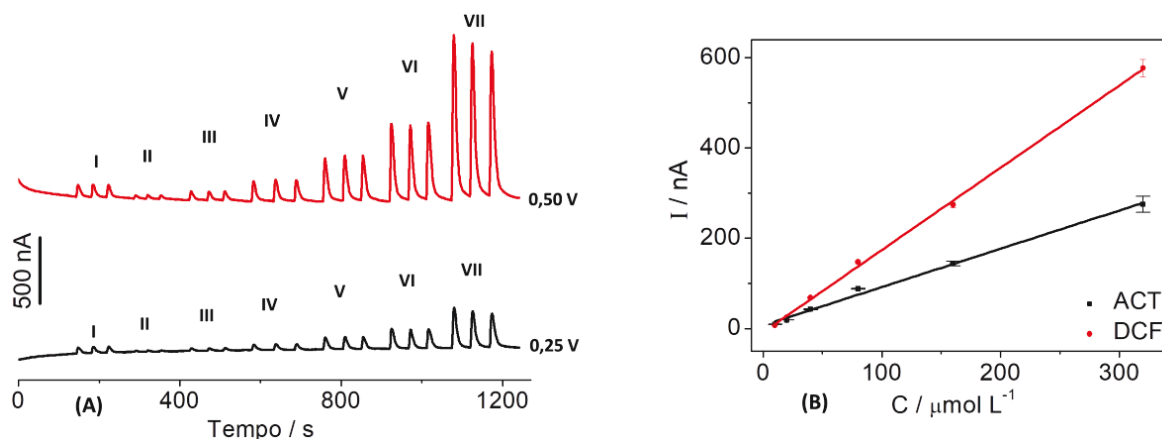


FONTE: O autor (2018).

Assim, para as análises realizadas no μ TED-1, foi obtido um desvio padrão relativo (RSD) de 2,81% e 2,95% para ACT e DCF, respectivamente. Em comparação com outros trabalhos que também empregaram a técnica de MPA (os quais apresentaram valores de RSD entre 1,9 e 3,0%),^{219,411} os RSDs do dispositivo proposto neste trabalho tiveram resultados similares. Desta forma, o estudo de repetibilidade comprovou o funcionamento adequado do μ TED-1, indicando uma vazão constante do eletrólito, além de injeções reprodutíveis, uma boa estabilidade dos eletrodos e inexistência de retenção dos analitos ao longo do dispositivo.

Na sequência, foi realizada a construção de uma curva de calibração no μ TED-1, através da determinação simultânea de ACT e DCF por MPA com injeções de soluções contendo $40,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de ACT (para o cálculo de CF) e seis concentrações crescentes da mistura de $10,0 - 320,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de ACT + $10,0 - 320,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de DCF. Os sinais transientes obtidos em $0,25$ e $0,50 \text{ V}$ são mostrados na Figura 50A, além das curvas de calibração referentes ao ACT e DCF (Figura 50B).

Figura 50. (A) Respostas obtidas por MPA no μ TED-1 para injeções ($n = 3$) de soluções contendo (I) apenas $40,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de ACT (para o cálculo do CF) e (II-VII) soluções contendo a mistura de ACT e DCF entre $10,0$ e $320,0 \mu\text{mol L}^{-1}$. Pulsos de potencial aplicados: $0,25 \text{ V} / 500 \text{ ms}$ e $0,50 \text{ V} / 500 \text{ ms}$; eletrólito de suporte: PB $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ pH $7,4$; volume de injeção: $2,0 \mu\text{L}$. (B) Curvas de calibração para ACT e DCF, as quais correspondem as respostas obtidas por MPA em A.



FONTE: O autor (2018).

Os valores de corrente correspondentes ao DCF (curva de calibração, Figura 50B) foram calculados usando as equações 3 e 4 (página 101) e o valor de CF obtido na própria análise. As curvas de calibração apresentaram ótimas linearidades para as concentrações avaliadas, com as seguintes equações de regressão linear obtidas:

$$\text{ACT: } i(\text{nA}) = 6,87 + 0,849 C_{\text{ACT}} (\mu\text{mol L}^{-1}) \quad (R^2 = 0,9936) \quad (5)$$

$$\text{DCF: } i(\text{nA}) = -8,34 + 1,82 C_{\text{DCF}} (\mu\text{mol L}^{-1}) \quad (R^2 = 0,9988) \quad (6)$$

Por fim, o limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) foram obtidos a partir dos dados gerados pela curva de calibração e calculados de acordo com as equações 7 e 8, respectivamente:⁴¹²

$$\text{LD} = 3\text{SD} / b \quad (7)$$

$$\text{LQ} = 10\text{SD} / b \quad (8)$$

onde SD corresponde a média do desvio padrão da linha base das provas em branco e b é o coeficiente angular das curvas analíticas mostradas na Figura 50. O LD e LQ obtidos foram de $1,4$ e $4,8 \mu\text{mol L}^{-1}$ para o ACT e de $2,5$ e $8,3 \mu\text{mol L}^{-1}$ para o DCF, respectivamente. Os resultados de LD e da faixa linear observados com o μ TED-1 foram similares aos valores reportados em recentes estudos que também utilizaram dispositivos microfluídicos ou que empregaram a técnica de MPA para a determinação individual de ACT e DCF (Tabela 4), visto que até o presente momento, não há relatos de estudos que utilizaram dispositivos microfluídicos ou a técnica de MPA para a determinação simultânea de ACT e DCF.

Tabela 4. Comparação dos valores de LD e faixa linear para a determinação de ACT e DCF com o μ TED-1 e com outros dispositivos relatados na literatura.

Espécie	LD / $\mu\text{mol L}^{-1}$	Faixa linear / $\mu\text{mol L}^{-1}$	Dispositivo / Técnica
ACT	0,3	0,4 – 100,0	Dispositivo microfluídico/Detecção amperométrica ²⁶⁹
ACT	25,0	50,0 – 2000,0	Dispositivo microfluídico/Detecção amperométrica ³⁹⁴
ACT	1,9	331,0 – 1656,0	Análise por injeção em batelada/MPA ⁴¹³
ACT	1,7	–	Análise por injeção em batelada/MPA ⁴¹⁴
ACT	1,4	10,0 – 320,0	Este trabalho
DCF	11,0	10,0 – 50,0	Análise por injeção em batelada/MPA ⁴¹⁰
DCF	0,1	5,0 – 50,0	Análise por injeção em fluxo/MPA ⁴¹⁵
DCF	2,5	10,0 – 320,0	Este trabalho

FONTE: O autor (2018). Valores obtidos das referências 269, 394, 410, 413-415.

Portanto, os resultados observados nos estudos referentes a avaliação da montagem do μ TED-1 (parte I do projeto) mostraram um fluxo contínuo de eletrólito no canal microfluídico do dispositivo, ausência de contaminação nos materiais que compõe o dispositivo, estabilidade nas medidas eletroquímicas e boa sensibilidade, o que se deve ao cuidado na manipulação dos seus componentes, a aplicação do potencial na forma pulsada e ao fluxo contínuo de eletrólito de suporte, o qual promove uma eficiente limpeza da superfície dos eletrodos após cada injeção do analito. Além disso, foi observada uma frequência analítica de 45 injeções por hora, um valor significativo considerando que as características do μ TED-1 ainda não foram otimizadas nesta parte do projeto e que o dispositivo não utiliza nenhum sistema de bombeamento mecânico das soluções, apenas a capilaridade e força gravitacional para o transporte das soluções ao longo do canal microfluídico.

4.2 PARTE II – μ TED-2

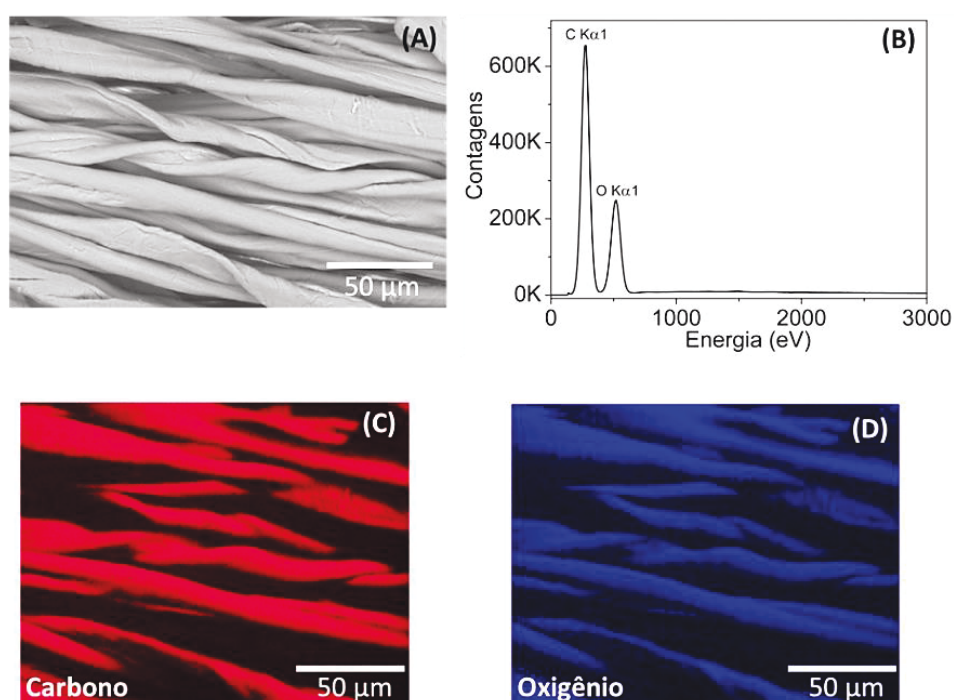
Nesta parte do projeto, as principais características do μ TED foram estudadas e otimizadas, através da avaliação da influência de diversos parâmetros relacionados as medidas eletroquímicas e a configuração do dispositivo, de modo a compreender os fenômenos que ocorrem nas análises em microfluxo e permitir o aprimoramento das características analíticas do μ TED-2 para a realização de μ FIA com o melhor desempenho possível. Para auxiliar nos estudos, nesta parte do projeto foi utilizado o NPX como analito, com sua detecção sendo realizada por cronoamperometria. O custo do dispositivo construído nesta parte do trabalho foi de 2,53 reais, valor um pouco superior ao μ TED-1 devido a utilização de uma maior quantidade de placas de vidro para a montagem da base do μ TED-2.

4.2.1 Caracterizações superficiais do canal microfluídico

Para a realização de análises em microfluxo no μ TED sem interferências ou flutuações nas medidas, os fios de algodão usados na construção dos canais microfluídicos devem ser hidrofílicos e livres de compostos não celulósicos como cera, proteína, pectina e sais inorgânicos, os quais naturalmente estão presentes na superfície das fibras de algodão.^{416,417} A presença de cera (a qual consiste em longas cadeias de ácidos graxos) é especialmente indesejável, pois torna a superfície dos fios de algodão hidrofóbica, dificultando ou até impedindo o transporte de soluções por capilaridade, devido a diminuição da polaridade dos fios com o recobrimento dos grupos hidroxilas da celulose.

Desta forma, caracterizações superficiais foram realizadas para avaliar a necessidade de limpeza dos fios de algodão (retirados da gaze hidrófila) antes da sua utilização no μ TED-2. Através da micrografia de MEV mostrada na Figura 51A, foi observado que as fibras de algodão possuem uma superfície rugosa (devido às nanofibrilas presentes na parede de celulose) e que não contém nenhum contaminante, visto a ausência de partículas ou diferentes contrastes (o qual seria um indicativo da presença de compostos diferentes da celulose das fibras) na imagem de MEV com elétrons retroespalhados.

Figura 51. (A) Micrografia representativa de MEV com elétrons retroespalhados das fibras de algodão. (B) Espectro de EDS e (C-D) mapeamentos químicos elementar da área mostrada em A.

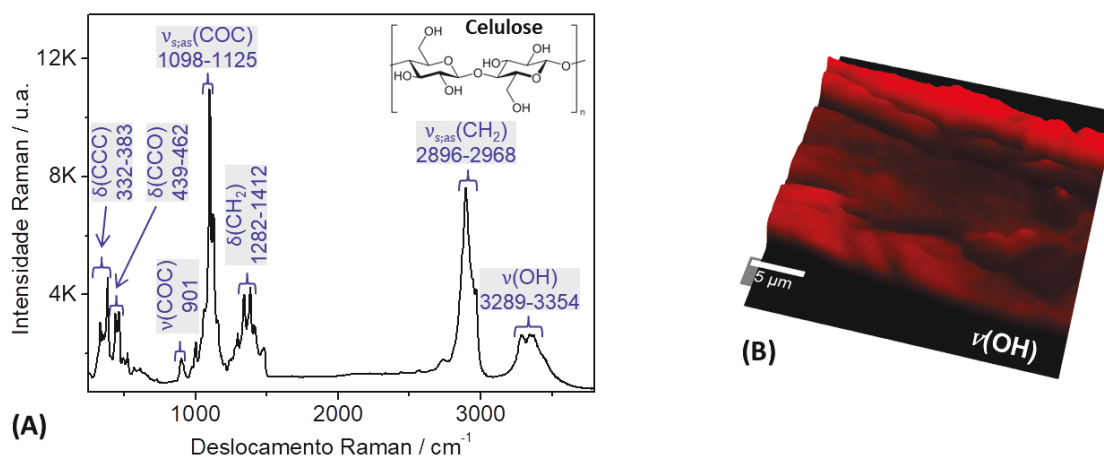


FONTE: O autor (2018).

Além disso, o espectro de EDS (Figura 51B) e os mapeamentos químicos (Figuras 51C-D) indicaram a presença apenas de carbono e oxigênio, os quais são provenientes das moléculas de celulose, confirmando dessa forma a ausência de contaminantes inorgânicos sobre os fios de algodão.

De forma complementar aos dados de MEV e EDS, as análises Raman obtidas dos fios de algodão indicaram que a superfície das fibras contém apenas celulose, de acordo com as bandas vibracionais obtidas e as atribuições correspondentes mostradas na Figura 52A (onde são indicadas as principais bandas) e apresentadas na Tabela 5 (descrição completa).⁴¹⁸⁻⁴²⁰ Dentre todas as informações do espectro Raman, é importante observar a presença das bandas em 3289 e 3354 cm^{-1} , as quais correspondem aos grupos -OH , que estão relacionados com a polaridade da superfície dos fios de algodão e, conseqüentemente, com sua maior afinidade por água (caráter hidrofílico).

Figura 52. (A) Espectro Raman obtido das fibras de algodão com a indicação das principais atribuições das bandas vibracionais. (B) Mapeamento Raman do grupo OH de uma fibra de algodão.



FONTE: O autor (2018). Atribuições retiradas das referências 418-420.

Assim, foi realizado um mapeamento Raman de uma fibra de algodão com o monitoramento apenas do grupo -OH (Figura 52B), sendo observado que o grupo hidroxila (e conseqüentemente a celulose) estava exposto ao longo de toda a superfície da área analisada, sem o aparecimento de regiões onde a celulose eventualmente poderia estar encoberta por outros compostos naturais, tal como a cera. Desta forma, nenhum tratamento prévio a utilização dos fios no $\mu\text{TED-2}$ foi necessário, visto que os processos de limpeza realizados durante a fabricação da gaze hidrófila mostram ser suficientes para a remoção de todas as impurezas e compostos não celulósicos dos fios de algodão.

Tabela 5. Bandas vibracionais e atribuições correspondentes observadas nos fios de algodão que compõe o canal microfluídico do μ TED-2.

Número de onda (cm^{-1})	Atribuição
332	$\delta(\text{CCC})$ anel
351	$\delta(\text{CCC})$ anel
383	$\delta(\text{CCC})$ anel
439	$\delta(\text{CCO})$ anel
462	$\delta(\text{CCO})$ anel
489-494	$\delta(\text{COC})$ ligação glicosídica
521	$\delta(\text{COC})$ ligação glicosídica
566-571	$\delta(\text{COC})$ ligação glicosídica, no plano
612	$\delta(\text{CCH})$ torção
901	$\nu_s(\text{COC})$ no plano
973	$\nu_s(\text{CH}_2)$
1000	$\nu_s(\text{CH}_2)$
1038	$\nu(\text{CO})$ 1° álcool
1060	$\nu(\text{CO})$ 2° álcool
1098	$\nu_{as}(\text{COC})$ ligação glicosídica
1125	$\nu_s(\text{COC})$ ligação glicosídica; $\nu(\text{COC})$ respiração do anel
1154	$\nu_{as}(\text{CC})$ respiração do anel
1205	$\delta(\text{COH})$; $\delta(\text{CCH})$
1240	$\delta(\text{COH})$ fora do plano
1282	$\delta(\text{CH}_2)$ torção
1297	$\delta(\text{CH}_2)$ torção
1341	$\delta(\text{CH}_2)$ balanço
1383	$\delta(\text{CH}_2)$
1412	$\delta(\text{CH}_2)$
1465	$\delta(\text{CH}_2)$; $\delta(\text{COH})$ álcool primário
1480	$\nu(\text{CH}_2)$ <i>scissors</i>
2735	$\nu(\text{CH})$ metina
2896	$\nu_{s,as}(\text{CH}_2)$
2968	$\nu(\text{CH}_2)$
3289	$\nu(\text{OH})$, COH , ligação hidrogênio
3354	$\nu(\text{OH})$ livre

Abreviações – ν : estiramento, δ : deformação.

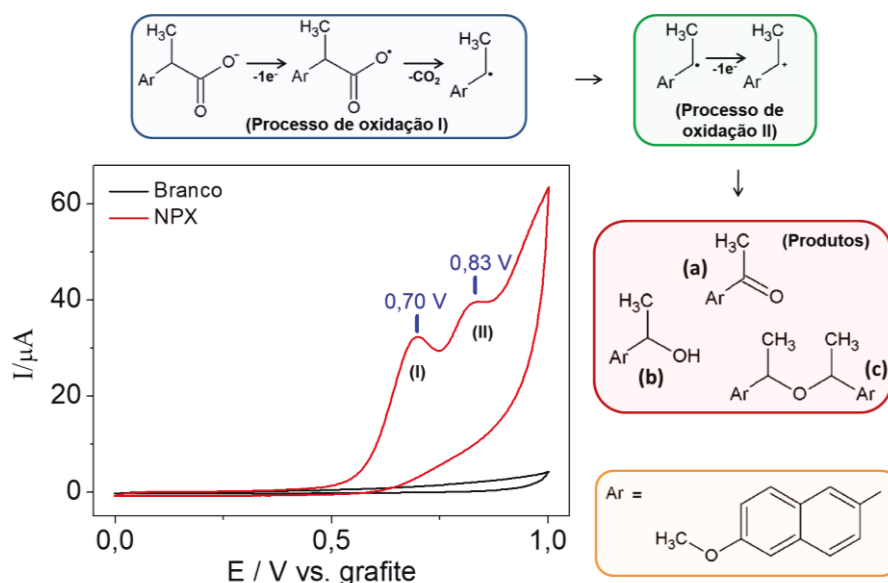
FONTE: Referências 418-420.

4.2.2 Comportamento eletroquímico do naproxeno

Para avaliar os processos eletroquímicos que ocorrem durante a detecção do NPX no μ TED-2, CVs (entre 0,0 e 1,0 V) na ausência (apenas em PB 0,10 mol L⁻¹ pH 7,4)

e na presença de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de NPX foram obtidos. O CV correspondente ao branco (linha preta na Figura 53), não apresentou nenhum processo faradaico, apenas um pequeno aumento nos valores de corrente da linha base para os potenciais mais positivos, o que se deve ao início do processo de evolução de O_2 , indicando assim a ausência de contaminantes na superfície dos eletrodos e uma boa limpeza do dispositivo.

Figura 53. CVs obtidos no $\mu\text{TED-2}$ na ausência (linha preta) e na presença (linha vermelha) de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de NPX. As reações de oxidação eletroquímica do NPX (processos I e II) e os respectivos produtos formados também são mostrados. Eletrólito de suporte: PB $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,4. Velocidade de varredura: 50 mV s^{-1} .



FONTE: O autor (2018). As reações foram adaptadas da referência 421.

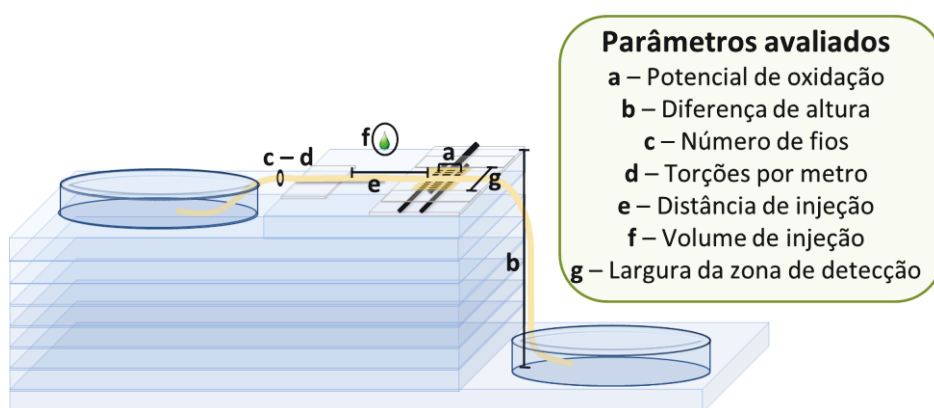
Já no CV obtido na presença de NPX (curva vermelha na Figura 53) foram observados dois processos anódicos em 0,70 e 0,83 V vs. grafite. De acordo com o mecanismo de oxidação eletroquímica do NPX (também mostrado na Figura 53), o primeiro processo (em 0,70 V) está relacionado com a transferência de um elétron para a formação de radicais intermediários não carregados com posterior descarboxilação. Já o segundo processo anódico (em 0,83 V) envolve a transferência de um segundo elétron e formação de um cátion. Por fim, ocorre a estabilização dos radicais e a formação irreversível dos produtos (a), (b) ou (c) indicados na Figura 53.⁴²¹ Consequentemente, no sentido catódico da varredura de potencial não foi observado nenhuma redução do analito.

4.2.3 Avaliação e otimização do $\mu\text{TED-2}$ para μFIA

As medidas realizadas no $\mu\text{TED-2}$ são fortemente influenciadas por características relacionadas às dimensões do dispositivo, do canal microfluídico e da zona de detecção,

local e volume de injeção da amostra e dos parâmetros da técnica de detecção. Assim, sete pontos de otimização (indicados pelas letras a-g na Figura 54) foram selecionados, seus valores variados e os efeitos avaliados de modo a obter um transporte das soluções estável e constante ao longo do tempo, além de uma relação sinal-ruído adequada para a realização de μ FIA com um bom desempenho analítico (alta sensibilidade, tempo curto de limpeza dos eletrodos e rapidez nas análises). Em todos os estudos relacionados na otimização do μ TED-2, foram utilizadas soluções contendo $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de NPX, PB $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,4 como eletrólito de suporte e detecção por cronoamperometria.

Figura 54. Características do μ TED-2 avaliadas e otimizadas (indicadas pelas letras a-g) para a realização de μ FIA com detecção cronoamperométrica.

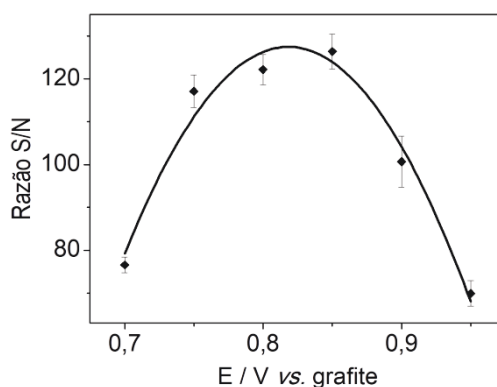


FONTE: O autor (2018).

O primeiro parâmetro avaliado e otimizado foi o potencial de oxidação. Baseado no perfil eletroquímico do NPX apresentado no estudo de CV, foram utilizados valores de potenciais entre 0,70 e 0,95 V vs. grafite, os quais abrangem os dois processos de oxidação obtidos para o NPX. Durante as avaliações, foi observado que a medida que o potencial aplicado tornava-se mais positivo, ocorria um aumento progressivo não apenas nos sinais transientes do NPX, mas também na linha base. Assim, para realizar uma avaliação precisa do efeito do potencial de oxidação na resposta do analito, ao invés de empregar os valores absolutos de corrente gerados na oxidação do NPX, foi utilizada a razão sinal-ruído (S/N), a qual foi obtida pela divisão da resposta eletroquímica correspondente ao sinal transiente do NPX pelo desvio padrão dos valores de corrente da linha base.

Desta forma, observando os resultados das análises obtidas no μ TED-2 em relação a variação do potencial de oxidação do NPX (Figura 55), foi percebido um aumento na razão S/N a medida que o potencial tornou-se mais positivo, alcançando um valor máximo em 0,85 V e diminuindo para potenciais mais positivos, devido a alta contribuição de corrente da linha base no sinal do analito. Portanto, para o decorrer do trabalho, foi selecionado um potencial de oxidação de 0,85 V, devido a melhor razão S/N.

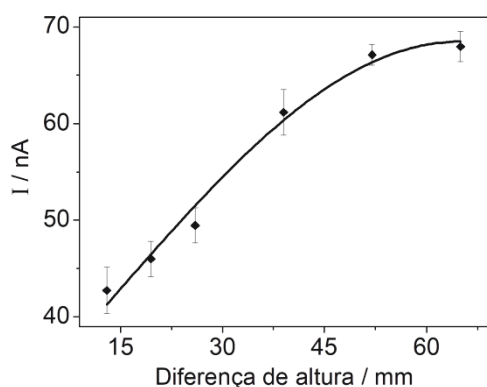
Figura 55. Razão sinal/ruído (S/N) para a determinação de $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de NPX por cronoamperometria para potenciais de oxidação entre 0,70 e 0,95 V. Eletrólito de suporte: PB $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,4; volume de injeção: $2,0 \mu\text{L}$.



FONTE: O autor (2018).

Na sequência, foi estudada a influência da diferença de altura entre os reservatórios de entrada e saída do $\mu\text{TED-2}$. Para isso, dispositivos com diferenças de altura de 13 a 65 mm (entre os reservatórios) foram construídos e suas respostas eletroquímicas avaliadas. Como pode ser observado na Figura 56, ocorreu um aumento quase linear nos valores de corrente a medida que a diferença de altura tornou-se maior (até 52 mm) devido ao aumento progressivo na vazão. Fenômeno que foi comprovado por um estudo feito em paralelo, onde foi observada uma relação linear entre a diferença de altura dos reservatórios (entre 13 e 65 mm) e a vazão do dispositivo, a qual é explicada pela ocorrência de um efeito sifão na região vertical do canal microfluídico (entre a zona de detecção e o reservatório de saída), auxiliando no escoamento das soluções no $\mu\text{TED-2}$ e, conseqüentemente, aumentado a vazão.^{151,422}

Figura 56. Influência da diferença de altura entre os reservatórios de entrada e saída do $\mu\text{TED-2}$ nos valores de corrente obtidos para a determinação de $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de NPX por cronoamperometria. Potencial aplicado: 0,85 V; eletrólito de suporte: PB $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,4; volume de injeção: $2,0 \mu\text{L}$.

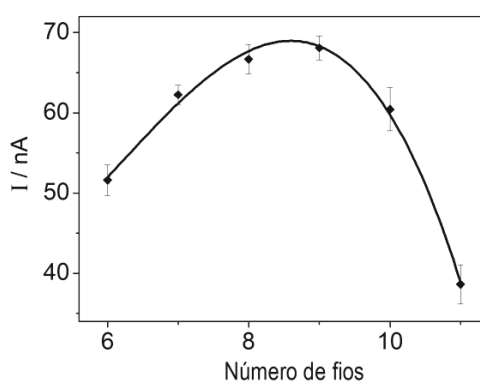


FONTE: O autor (2018).

Porém, para o dispositivo construído com uma diferença de altura de 65 mm, observou-se uma tendência de estabilização nas respostas cronoamperométricas, como mostrado na Figura 56, o que se deve ao limite eletroquímico obtido na corrente de difusão para o NPX nesta diferença de altura,⁴²³⁻⁴²⁵ fazendo com que o aumento na vazão não tivesse mais influência significativa no sinal do analito. Desta forma, foi adotada para os experimentos subsequentes, uma diferença de altura de 52 mm entre os reservatórios de entrada e saída do dispositivo.

O próximo parâmetro avaliado foi o número de fios de algodão usados para formar o canal microfluídico do μ TED-2. Para isso, dispositivos foram construídos com canais compostos por 6 a 11 fios de algodão, com suas respostas eletroquímicas sendo avaliadas na determinação de NPX. Conforme a quantidade de fios aumentou, os sinais transientes tornaram-se mais estreitos, devido a elevação na quantidade de microcanais (espaços entre os fios) responsáveis pelo transporte das soluções, refletindo em maiores vazões¹⁵² e, conseqüentemente, em um deslocamento mais rápido da amostra até a zona de detecção e em um menor tempo de limpeza da região dos eletrodos. Porém, observando o perfil dos valores de corrente obtidos (Figura 57), o máximo de sinal foi observado no dispositivo construído com 9 fios, visto que a medida que os canais tornam-se maiores (com o aumento do número de fios), ocorre também um aumento na diluição da amostra injetada. Assim, as maiores vazões obtidas nos canais construídos com 10 e 11 fios não compensaram o aumento na diluição da amostra e por isso, os dispositivos empregados para as próximas análises foram constituídos por canais contendo 9 fios.

Figura 57. Valores de corrente obtidos para a determinação de $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de NPX por cronoamperometria em dispositivos compostos por canais contendo de 6 a 11 fios de algodão. Potencial aplicado: 0,85 V; eletrólito de suporte: PB $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,4; volume de injeção: $2,0 \mu\text{L}$.



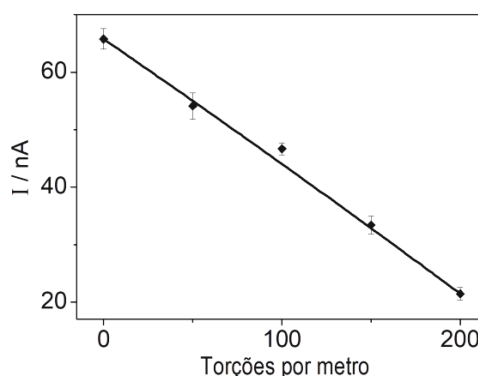
FONTE: O autor (2018).

As análises realizadas no μ TED-2 também são influenciadas pelo nível de compactação das fibras que compõem os fios de algodão do canal microfluídico, visto que o transporte das soluções ao longo dos fios ocorre principalmente nos espaços entre

as fibras e entre os fios,¹⁵⁷ sendo a torção um parâmetro que afeta diretamente o volume destes espaços. Por isso, o efeito da torção dos fios usados no μ TED-2 foi avaliado através da construção de dispositivos contendo 9 fios em paralelo (sem torção) e com valores crescentes de torções (entre 50 e 200 torções por metro), com os fios do canal sendo fixados (com fita dupla face) nas extremidades contidas nos reservatórios do μ TED-2, de modo a evitar alterações do número de torções durante a medida.

Através das análises cronoamperométricas obtidas para o NPX, foi verificada uma forte dependência entre os valores de corrente e o número de torções (Figura 58), sendo observadas intensidades de sinal menores e tempos de análise maiores com o aumento das torções. Tal comportamento se deve a diminuição dos espaços entre as fibras e entre os fios, o que gera uma maior resistência a passagem das soluções no canal microfluídico e consequentemente, reduz as vazões e diminui a resposta eletroquímica do analito. Assim, visando uma melhor performance analítica para a realização de μ FIA no μ TED-2, o arranjo dos fios sem torção foi adotado para os estudos posteriores.

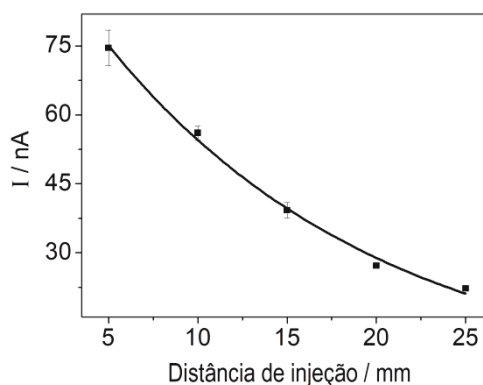
Figura 58. Relação entre o número de torções dos fios do canal microfluídico e os valores de corrente obtidos na determinação de $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de NPX. Potencial aplicado: $0,85 \text{ V}$; eletrólito de suporte: $\text{PB } 0,10 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,4; volume de injeção: $2,0 \mu\text{L}$.



FONTE: O autor (2018).

Com relação a injeção da amostra, dois estudos foram realizados. O primeiro estava relacionado com a distância entre o local de injeção do analito e a zona de detecção, de modo a avaliar o efeito do caminho analítico nos resultados obtidos com o μ TED-2. Desta forma, foram realizadas análises com injeções de NPX a uma distância de 5 a 25 mm da zona de detecção. Os resultados mostraram que quanto mais afastada da zona de detecção ocorreu a adição da amostra, menores foram os valores de corrente obtidos (Figura 59), o qual é atribuído a maior dispersão que ocorre com o analito adicionado no canal microfluídico em função do aumento do caminho analítico.⁴²⁶ Distâncias de injeção menores que 5 mm não foram exploradas devido a problemas de repetibilidade nas análises, visto a grande proximidade da zona de detecção. Assim, um caminho analítico de 5 mm foi selecionado para o decorrer do trabalho.

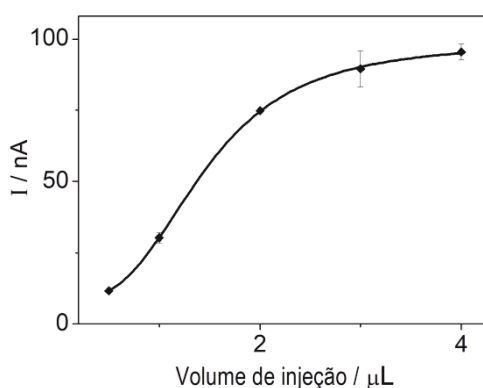
Figura 59. Efeito da distância entre o local de injeção e a zona de detecção nas respostas de corrente obtidas para a determinação de $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de NPX no $\mu\text{TED-2}$. Potencial aplicado: $0,85 \text{ V}$; eletrólito de suporte: PB $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,4; volume de injeção: $2,0 \mu\text{L}$.



FONTE: O autor (2018).

Em seguida, o efeito do volume de injeção da amostra no $\mu\text{TED-2}$ foi avaliado para uma faixa de $0,5$ a $4,0 \mu\text{L}$. Um aumento significativo nos valores de corrente foi observado quando o volume injetado de NPX aumentou de $0,5$ até $2,0 \mu\text{L}$ (Figura 60), comportamento que está relacionado a uma menor dispersão da área central da amostra quando volumes maiores são adicionados. Já para volumes de injeção de $3,0$ e $4,0 \mu\text{L}$, observou-se apenas um pequeno aumento nos valores de corrente e o vazamento de uma parte da amostra injetada para fora do canal microfluídico, o que se deve a incapacidade do canal em receber injeções de amostras superiores a $2,0 \mu\text{L}$, volume este que foi adotado para os experimentos subsequentes.

Figura 60. Influência do volume de injeção da amostra nas respostas cronoamperométricas para a detecção de $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de NPX. Potencial aplicado: $0,85 \text{ V}$; eletrólito de suporte: PB $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,4.

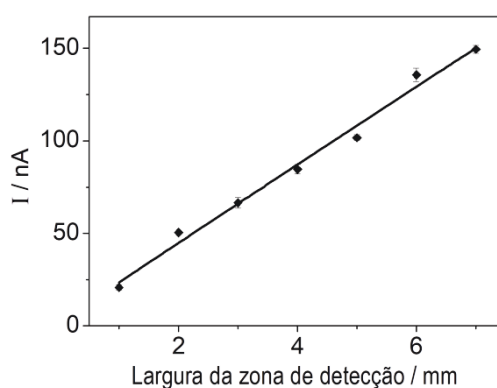


FONTE: O autor (2018).

A última característica do $\mu\text{TED-2}$ estudada e otimizada foi a largura da zona de detecção, com a avaliação de dispositivos contendo áreas de detecção com larguras

entre 1 e 7 mm. Para manter uma quantidade mínima de solução sobre a área dos eletrodos e permitir a realização das análises eletroquímicas, pedaços de fios de algodão com 6 mm de comprimento foram colocados sobre a zona de detecção em paralelo com o canal microfluídico. De acordo com as respostas obtidas, foram observados valores de corrente maiores com o aumento do tamanho da zona de detecção (Figura 61), devido a maior exposição da área ativa dos eletrodos. No entanto, ocorreu um alargamento significativo nos sinais transientes para a análise realizada no dispositivo construído com uma zona de detecção contendo 7 mm de largura. Este efeito foi causado pela necessidade de um tempo maior para que todo o analito injetado fosse retirado da região dos eletrodos. Desta forma, os dispositivos empregados no decorrer do trabalho foram construídos com uma zona de detecção com largura de 6 mm.

Figura 61. Efeito da largura da zona de detecção do μ TED-2 nos sinais obtidos para a determinação de $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de NPX. Potencial aplicado: 0,85 V; eletrólito de suporte: PB $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,4; volume de injeção: $2,0 \mu\text{L}$.

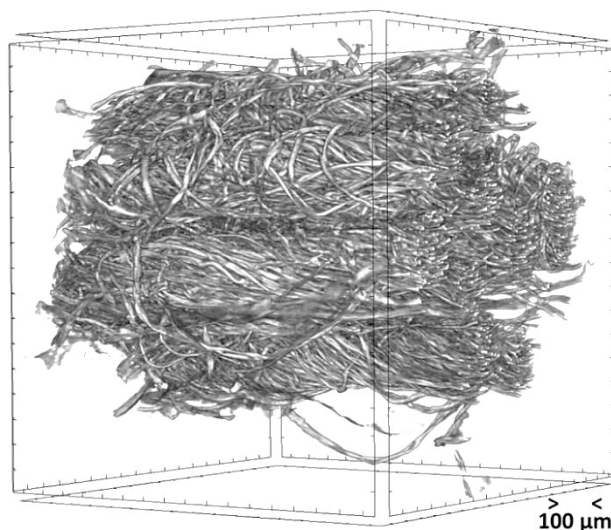


FONTE: O autor (2018).

4.2.4 Caracterização do μ TED-2

Após estabelecer a melhor configuração do μ TED-2 para a realização de μ FIA, alguns estudos adicionais foram feitos com o objetivo de caracterizar o transporte das soluções e amostras no dispositivo, além de avaliar a estabilidade nas análises para a determinação de NPX. Inicialmente, foi realizada a caracterização do canal microfluídico pela técnica de microtomografia de raios-X, sendo obtida uma reconstrução 3D do canal microfluídico (Figura 62), onde pode ser observado o arranjo em paralelo dos fios de algodão, com a formação de um canal microfluídico com formato esférico.

Figura 62. Visualização 3D do canal do μ TED-2 reconstruído a partir de imagens obtidas por microtomografia de raios-X.



FONTE: O autor (2018).

Além da reconstrução tridimensional, a análise de microtomografia de raios-X forneceu também diversas informações sobre área e volume, com as quais foi possível obter várias características do canal microfluídico (Tabela 6), tais como o número de fibras de algodão que compõe o canal, o diâmetro e a área média de cada fibra e a área total ocupada pelas fibras. Além disso, foi possível calcular a área total em seção transversal e a área livre média (espaços vazios) presente no canal, a qual é dividida em centenas de microcanais formados pelos espaços entre as fibras e entre os fios, os quais são os responsáveis pelo transporte das soluções no μ TED-2.

Tabela 6. Características do canal microfluídico que compõe o μ TED-2 obtidas por microtomografia de raios-X.

Característica	Valor
Número de fibras	1134
Diâmetro médio das fibras	15 μm
Área média das fibras	181 μm^2
Área total do canal	0,88 mm^2
Área ocupada pelas fibras	0,20 mm^2
Porcentagem da área ocupada pelas fibras	22,7%
Área livre no canal	0,68 mm^2
Porcentagem de espaços livres	77,3%

FONTE: O autor (2018).

Na sequência, foram realizadas caracterizações relativas ao transporte de soluções e amostras pelo μ TED-2. Inicialmente, foram avaliados cinco dispositivos para a

obtenção da vazão média alcançada pelo eletrólito no μ TED-2, sendo observada uma vazão de $2,2 \pm 0,1 \mu\text{L s}^{-1}$, valor maior do que o apresentado por outros dispositivos (com valores relatados entre $0,0035$ e $0,17 \mu\text{L s}^{-1}$) que também utilizaram o transporte das soluções através de bombas passivas (sem a utilização de sistemas mecânicos de bombeamento).^{422,427-429} A alta vazão apresentada pelo μ TED-2 é explicada pela grande quantidade de espaços entre as fibras e os fios presentes no canal microfluídico, como obtido pela análise de microtomografia de raios-X, e pelo efeito sifão gerado pela diferença de altura dos reservatórios de entrada e saída.

Em seguida, foi realizada a estimativa da frequência analítica do dispositivo, através de injeções regulares ($n = 20$) de uma solução de $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de NPX. De acordo com as respostas observadas, foi obtida a largura média dos sinais transientes gerados ($17,3 \text{ s}$), valor que foi utilizado para calcular a quantidade de injeções possíveis em 3600 s (1 h) de análise, sendo obtido um valor de 208 injeções por hora, resultado melhor do que o relatado por outros estudos que empregaram dispositivos microfluídicos (com valores entre 60 e 116 injeções por hora) para a realização de análise em fluxo.⁴³⁰⁻

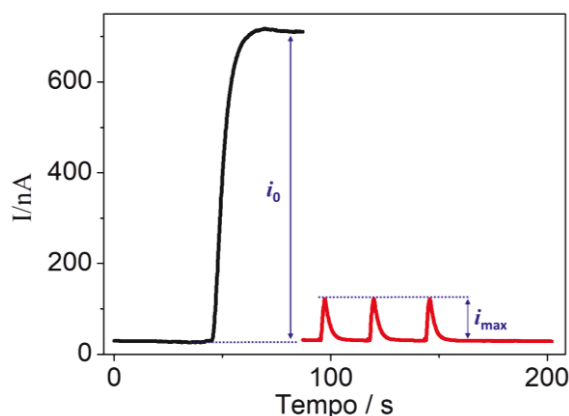
⁴³³ Além disso, com base na vazão e na frequência analítica, a estimativa de resíduo gerado para a detecção de cada sinal transiente no μ TED-2 foi de aproximadamente $40,0 \mu\text{L}$, valor extremamente baixo quando comparado com os sistemas FIA convencionais (os quais apresentam volumes de resíduos entre $1,1$ e $7,1 \text{ mL}$)⁴³⁴⁻⁴³⁷ e interessante para o desenvolvimento de metodologias de análise mais “verdes”.¹⁷⁰

Também foi realizada a avaliação da diluição experimentada pela amostra ao ser injetada no canal microfluídico do μ TED-2, com a obtenção do coeficiente de dispersão (D) do analito, o qual foi calculado de acordo com a seguinte equação:

$$D = \frac{i_0}{i_{max}} \quad (9)$$

onde i_0 é a corrente obtida em condições de volume infinito e i_{max} é corrente obtida para o volume injetado. O coeficiente de dispersão do analito no canal pode ser classificado como limitado ($D = 1-3$), médio ($D = 3-10$) ou alto ($D > 10$).⁴³⁸ Inicialmente, foi obtido o valor de i_0 para o NPX no μ TED-2, através da adição de uma solução contendo $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ do analito no reservatório de entrada e realização da medida por cronoamperometria (linha preta na Figura 63). Na sequência, o valor de i_{max} foi obtido com a realização de injeções (diretamente no canal microfluídico) com volume de $2,0 \mu\text{L}$ da mesma solução de NPX ($50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$) utilizada anteriormente (linha vermelha na Figura 63) e com o reservatório de entrada contendo apenas eletrólito de suporte (PB $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ pH $7,4$). Assim empregando a equação 9, o valor obtido para D no μ TED-2 foi de $7,7$, indicando uma diluição média do analito no canal microfluídico do dispositivo.

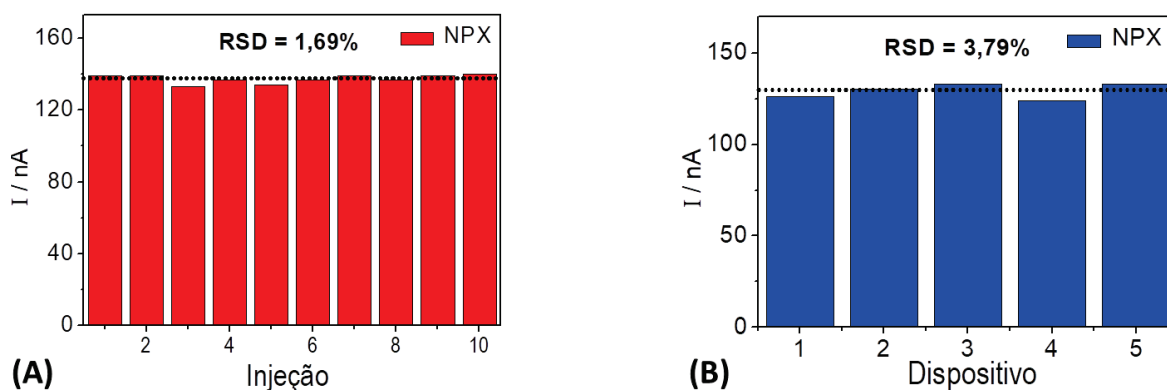
Figura 63. Cronoamperogramas obtidos para injeção contínua e injeções intermitentes de NPX no μ TED-2. Potencial aplicado: 0,85 V.



FONTE: O autor (2018).

Por fim, foi avaliada a estabilidade das medidas cronoamperométricas realizadas por μ FIA no μ TED-2, tanto para injeções consecutivas (repetibilidade) quanto para diferentes dispositivos construídos (reprodutibilidade). Para o estudo de repetibilidade, foram realizadas 10 injeções de uma solução de $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de NPX, sendo observado um RSD de 1,69% nos valores de corrente dos sinais transientes do analito (Figura 64A). Na avaliação da reprodutibilidade, foram feitas análises com 5 dispositivos diferentes para injeções ($n = 5$) de uma solução contendo $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de NPX, sendo obtido um RSD de 3,79% (Figura 64B). Desta forma, os resultados de estabilidade indicaram um bom controle no processo de montagem dos dispositivos, além de uma grande repetibilidade entre as injeções, a ausência de flutuações no fluxo e uma limpeza eficiente da zona de detecção.

Figura 64. Valores de corrente e RSDs obtidos na determinação de NPX com o μ TED-2 para os estudos de (A) repetibilidade e (B) reprodutibilidade. A linha pontilhada horizontal indica o valor médio das correntes obtidas. Potencial aplicado: 0,85 V; eletrólito de suporte: PB $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,4; volume de injeção: $2,0 \mu\text{L}$.



FONTE: O autor (2018).

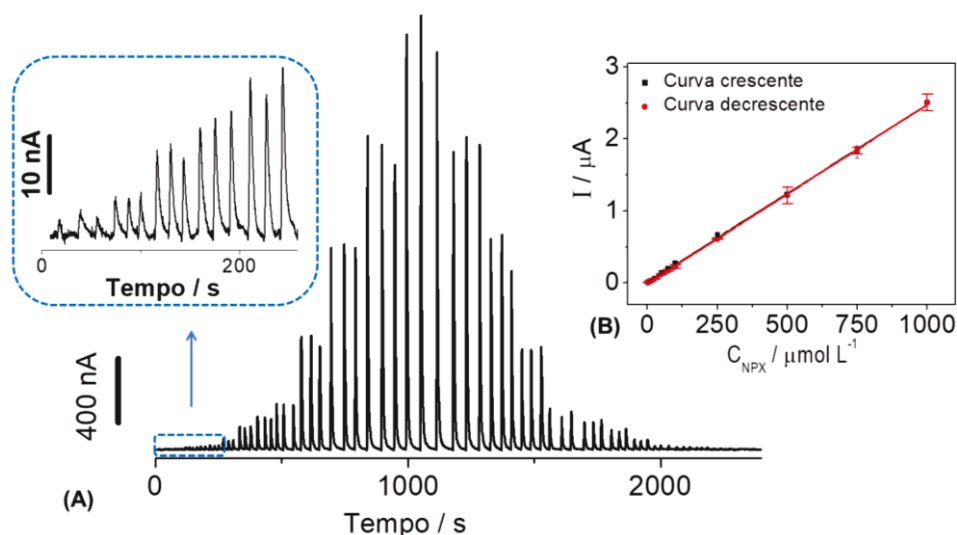
4.2.5 Desempenho analítico do μ TED-2 para a determinação de naproxeno

Para a avaliação do desempenho analítico do μ TED-2 na determinação eletroquímica de NPX, uma curva de calibração foi construída através da injeção de treze concentrações do analito na faixa entre $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $1,0 \text{mmol L}^{-1}$. Os sinais transientes obtidos através das medidas cronoamperométricas em μ FIA são mostrados Figura 65A. Respostas lineares foram observadas ao longo de toda faixa estudada, com a obtenção da seguinte equação de regressão linear:

$$i(\text{nA}) = -0,11 (\text{nA}) + 2,48C_{\text{NPX}} (\mu\text{mol L}^{-1}) \quad (R^2 = 0,9997) \quad (10)$$

Além disso, foi calculado um desvio de apenas 0,68% na sensibilidade das curvas de calibração para as injeções de concentrações crescentes ($2,47 \text{ nA } \mu\text{mol}^{-1} \text{ L}$) e decrescentes ($2,48 \text{ nA } \mu\text{mol}^{-1} \text{ L}$) de NPX (Figura 65B), indicando a ausência de efeito de memória nos eletrodos.

Figura 65. (A) Respostas cronoamperométricas obtidas com o μ TED-2 para injeções ($n = 3$) de NPX na faixa entre $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $1,0 \text{mmol L}^{-1}$. No detalhe, os sinais transientes das cinco menores concentrações de NPX injetadas ($1,0 \mu\text{mol L}^{-1} - 10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$). Potencial aplicado: $0,85 \text{ V}$; eletrólito de suporte: PB $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,4; volume de injeção: $2,0 \mu\text{L}$. (B) Curvas de calibração correspondentes aos valores de correntes obtidos em A.



FONTE: O autor (2018).

Os valores de LD e LQ para o NPX foram calculados a partir dos dados gerados nas análises da Figura 65 e utilizando as equações 7 e 8 (descritas na página 103), sendo obtido um LD de $0,3 \mu\text{mol L}^{-1}$ e um LQ de $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$. Assim, para a determinação

de NPX, o μ TED-2 apresentou uma faixa linear e um LD com valores similares aos reportados na literatura em trabalhos que também empregaram as técnicas eletroquímicas para a determinação deste analito (Tabela 7).

Tabela 7. Faixas lineares e LDs obtidos com o μ TED-2 e em trabalhos na literatura para a determinação eletroquímica de NPX.

Eletrodo	Técnica	Faixa linear ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	LD ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Ref.
Eletrodo de platina	DPV	4,3 – 108,6	1,0	278
MWCNT-GCE	Amperometria	10,0 – 200,0	0,6	421
HSB β CD	Potenciometria	50,0 – 10000,0	10,0	283
OCMIP	QCM	0,1 – 15,0	0,04	439
Eletrodo de barra de grafite	DPV	14,3 – 122,4	2,9	440
BDD	DPV	0,5 – 50,0	0,03	441
ZnO/MWCNT/CPE	SWV	1,0 – 200,0	0,2	282
Eletrodo de grafite	Cronoamperometria	1,0 – 1000,0	0,3	Este trabalho

Abreviaturas: MWCNT-GCE – Eletrodo de carbono vítreo modificado com nanotubos de carbono de múltiplas paredes. HSB β CD – sensor potenciométrico baseado em heptaquis (2,3,6-tri-O-benzoil) - β – ciclodextrina. OCMIP – Sensor baseado em filme condutor superoxidado de polipirrol molecularmente impresso. BDD – Eletrodo de diamante dopado com boro. ZnO/MWCNT/CPE – Eletrodo de pasta de carbono modificado com nanopartículas de ZnO e nanotubos de carbono. DPV – Voltametria de pulso diferencial. QCM – Microbalança de cristal de quartzo. SWV – Voltametria de onda quadrada.

FONTE: O autor (2018). Valores obtidos das referências 278, 282, 283, 421, 439-441.

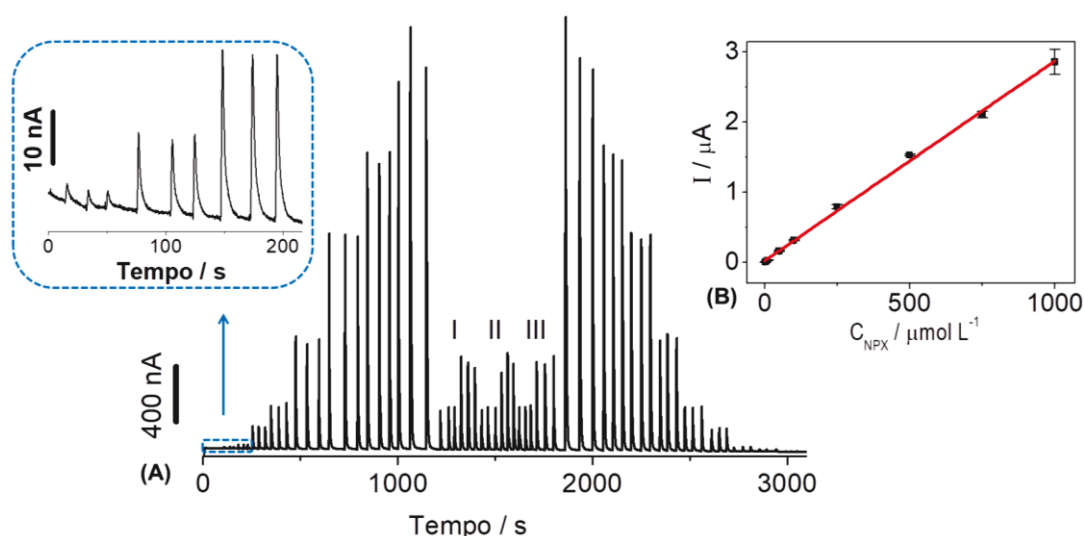
4.2.6 Determinação de naproxeno em formulações farmacêuticas

Por fim, para avaliar o desempenho do μ TED-2 na determinação de NPX em amostras reais, uma nova curva de calibração foi construída através da adição de soluções de NPX padrão com concentrações entre $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $1,0 \text{mmol L}^{-1}$, além da injeção de soluções preparadas com comprimidos de três marcas diferentes, com e sem a adição de solução padrão do analito (Figura 66A). A quantificação das concentrações de NPX encontradas nas amostras de comprimidos e os valores de recuperação do padrão adicionado foram calculados através da interpolação dos valores de corrente obtidos pelos sinais transientes das amostras na equação da reta correspondente a curva de calibração (Figura 66B).

A quantidade de NPX encontrada nas amostras de fármacos através das análises feitas com o μ TED-2 apresentaram valores próximos dos indicados nas embalagens dos produtos (diferença $\leq 10\%$) (Tabela 8). Para as medidas realizadas com as soluções das amostras enriquecidas com solução padrão de NPX, foram obtidos valores de recuperação entre 98 e 104%, além de RSDs entre as medidas de ± 2 a $\pm 4\%$. Tais

resultados mostraram uma boa precisão nas análises realizadas com o dispositivo, ausência de espécies interferentes nas amostras comerciais (comprimidos) e a capacidade do μ TED-2 em realizar μ FIA em amostras reais de fármacos.

Figura 66. (A) Sinais transientes obtidos por μ FIA no μ TED-2 para injeções de soluções de NPX padrão com concentrações entre $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $1,0 \text{mmol L}^{-1}$ e injeções das amostras de comprimidos (indicadas pelas letras I-III). No detalhe, os sinais transientes das três menores concentrações de NPX injetadas ($1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ – $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$). Potencial aplicado: $0,85 \text{ V}$; eletrólito de suporte: PB $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,4; volume de injeção: $2,0 \mu\text{L}$. (B) Curva de calibração correspondente aos valores de correntes obtidos em A para o NPX padrão.



FONTE: O autor (2018).

Tabela 8. Determinação de NPX em amostras farmacêuticas com o μ TED-2.

Marca	Concentração estimada na amostra ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Concentração encontrada na amostra ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Adição de padrão de NPX na amostra ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Determinação da amostra + padrão de NPX ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Recuperação (%)
I	100,0	110 ± 6	100,0	208 ± 3	98 ± 3
II	100,0	103 ± 5	100,0	207 ± 4	104 ± 2
III	100,0	109 ± 4	100,0	211 ± 3	102 ± 4

FONTE: O autor (2018).

4.3 PARTE III – μ TED-3

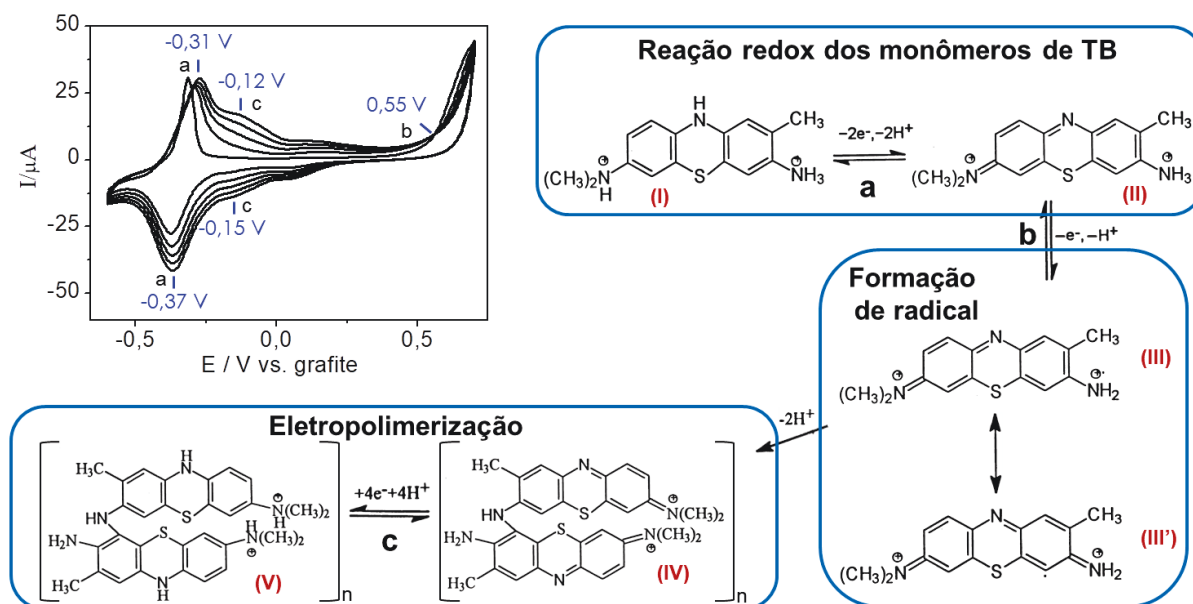
A terceira parte do projeto foi caracterizada pela integração ao μ TED-3 de um biossensor seletivo para glicose, o qual era baseado na enzima GOx (elemento seletivo para o analito) e no polímero PTB, que tinha a função de imobilizar a GOx na superfície do eletrodo (através do processo de polimerização da TB) e também atuar como um mediador redox durante a determinação eletroquímica de glicose. Nesta parte do projeto

também foram realizados estudos de caracterização e otimização do biossensor de PTB-GOx, avaliação do desempenho analítico do μ TED-3 e, por fim, aplicação do dispositivo para a detecção eletroquímica de glicose em lágrimas. O custo estimado do μ TED-3 foi de 2,55 reais, valor 0,02 reais superior ao μ TED-2 e está relacionado a construção do biossensor de PTB-GOx.

4.3.1 Construção do biossensor de PTB-GOx

A preparação do biossensor seletivo para glicose foi realizada através de um processo de eletropolimerização por CV, com a formação de um filme de PTB e GOx sobre a superfície do WE (composto por um eletrodo de grafite) fixado na zona de detecção do μ TED-3. Para isso, 50,0 μ L de uma solução de PB 0,10 mol L⁻¹ pH 7,4 contendo 5,0 mmol L⁻¹ de TB e 10,0 mg mL⁻¹ de GOx foi adicionada diretamente na zona de detecção do dispositivo, com a posterior aplicação de ciclos de CV entre -0,60 e 0,70 V (Figura 67).

Figura 67. CV realizada em solução contendo 5,0 mmol L⁻¹ de TB e 10,0 mg mL⁻¹ de GOx para a construção do biossensor de PTB-GOx. As reações e espécies geradas durante o processo também são mostradas. Velocidade de varredura: 50 mV s⁻¹.



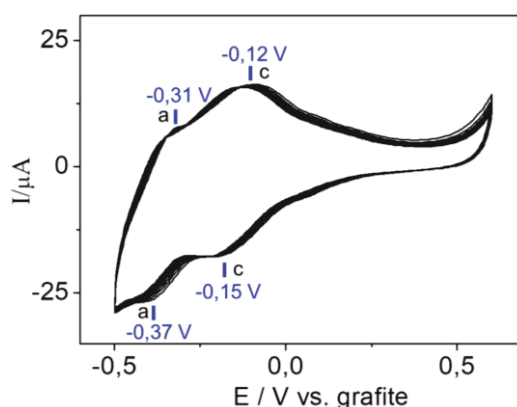
FONTE: O autor (2018). Reações adaptadas da referência 442.

Inicialmente, foi observado um par redox reversível (a) em -0,31 V (processo anódico) e -0,37 V (processo catódico) vs. grafite, os quais correspondem à reação dos monômeros de TB (estruturas I e II). Quando a varredura de potencial na direção anódica atingiu 0,55 V, ocorreu um aumento abrupto da corrente (b), correspondente à formação dos radicais catiônicos (estruturas III e III') associados à oxidação de um

elétron do grupo amino, o qual é necessário para a subsequente eletropolimerização da TB.⁴⁴² Consequentemente, um novo par redox (c) foi observado em -0,15 V na direção catódica e -0,12 V na direção anódica, os quais correspondem às estruturas IV e V formadas devido a dimerização dos monômeros através de reações de acoplamento carbono-nitrogênio, iniciando assim a formação do filme de PTB.⁴⁴³ Observou-se também que os valores de corrente relacionados ao par redox c aumentaram com o número de ciclos de CV, indicando a continuação do processo de eletropolimerização de PTB.

Para a avaliação da estabilidade do filme de PTB-GOx eletrodepositado na superfície do eletrodo de grafite, uma nova análise de CV entre -0,50 e 0,60 V foi realizada (Figura 68), com a adição de 50,0 μL de PB 0,10 mol L^{-1} pH 7,4 na zona de detecção do $\mu\text{TED-3}$ contendo o biossensor de PTB-GOx previamente lavado (para a remoção dos monômeros de TB não imobilizados).

Figura 68. CV do biossensor de PTB-GOx integrado ao $\mu\text{TED-3}$ obtido em PB 0,10 mol L^{-1} pH 7,4. Velocidade de varredura: 50 mV s^{-1} .



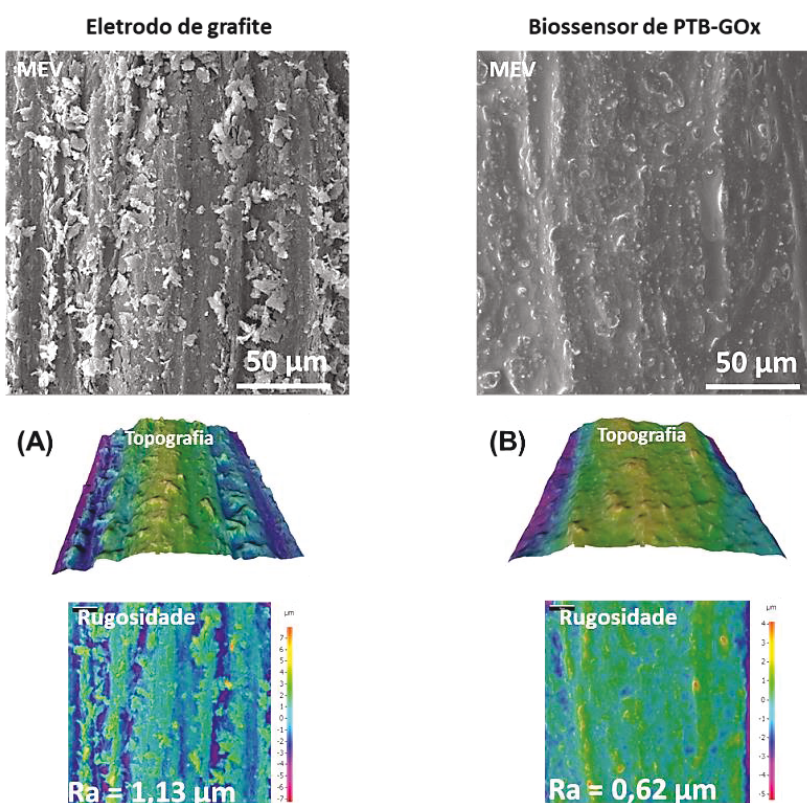
FONTE: O autor (2018).

Foi observado um par redox discreto (processo a do CV mostrado na Figura 68) em -0,31 V (sentido anódico) e -0,37 V (sentido catódico), o qual corresponde as unidades monoméricas de TB fortemente adsorvidas na matriz polimérica ou devido a conjugação do monômero no polímero de PTB.⁴⁴² Além disso, um segundo par redox mais intenso (processo c do CV mostrado na Figura 68) foi obtido em potenciais mais positivos (-0,12 V no sentido anódico e -0,15 V no sentido catódico), o qual refere-se ao polímero de PTB formado na superfície do eletrodo. É importante observar a estabilidade nas intensidades de corrente dos processos redox após cada ciclo de CV (10 ciclos no total), indicando uma eficiente imobilização do filme de PTB formado sobre a superfície do eletrodo de grafite.

4.3.2 Caracterizações superficiais dos eletrodos

As análises da superfície do eletrodo de grafite e do biossensor foram realizadas para avaliar a morfologia do grafite e a homogeneidade do filme de PTB-GOx. Através das micrografias de MEV e das reconstruções 3D, foi observada que a superfície do grafite antes da deposição do filme de PTB e GOx (Figura 69A) apresentava uma morfologia irregular e uma rugosidade média (R_a) de $1,13\ \mu\text{m}$. Após a etapa de eletropolimerização, a morfologia do biossensor (Figura 69B) tornou-se menos irregular e com uma significativa diminuição na rugosidade (R_a de $0,62\ \mu\text{m}$), indicando a incorporação de um filme sobre a superfície do eletrodo de grafite.

Figura 69. Caracterizações representativas de MEV, incluindo micrografias e reconstruções 3D da topografia e da rugosidade do (A) eletrodo de grafite e do (B) biossensor de PTB-GOx.

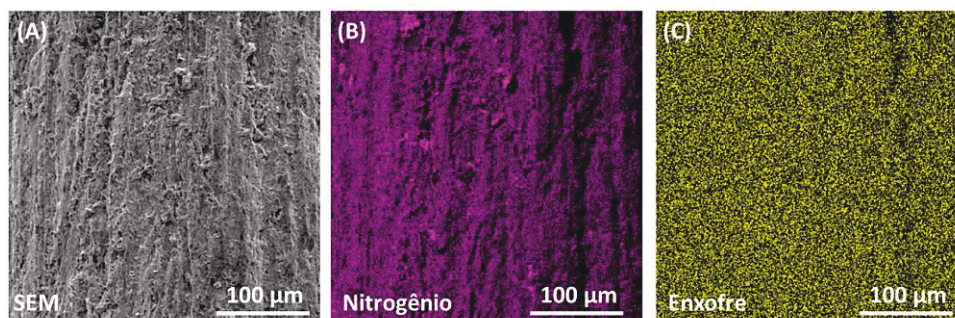


FONTE: O autor (2018).

A superfície do biossensor de PTB-GOx também avaliada com relação a sua composição química, através da realização de uma análise de EDS com mapeamento químico, onde foi observada a presença (dentre outros elementos) de nitrogênio e enxofre (os quais são elementos constituintes das moléculas de TB e GOx) ao longo de toda a superfície do biossensor (Figura 70), indicando assim que a eletropolimerização de

PTB e GOx ocorreu de forma homogênea sobre o eletrodo de grafite que funciona como WE no μ TED-3.

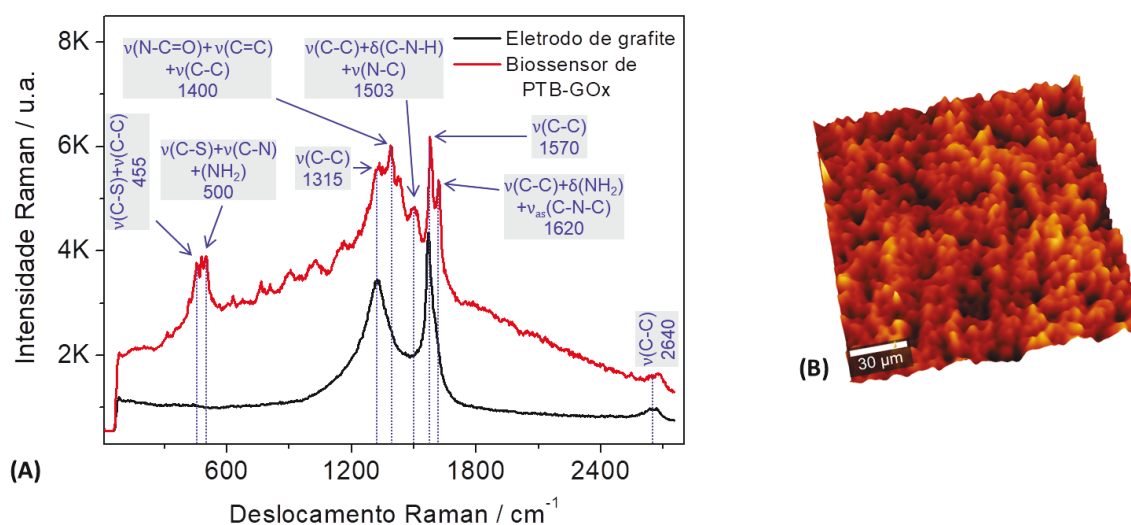
Figura 70. (A) Micrografia de MEV com elétrons secundários e mapeamento químico de EDS da superfície do biossensor de PTB-GOx obtida para o (B) nitrogênio e para o (C) enxofre.



FONTE: O autor (2018).

Para complementar as informações de MEV e EDS, análises Raman foram feitas da superfície dos eletrodos antes e após a eletrodeposição do filme de PTB e GOx. Como mostrado na Figura 71A, o espectro correspondente ao eletrodo de grafite apresentou apenas as bandas em 1315 , 1570 e 2640 cm^{-1} , que correspondem as bandas características do grafite D, G e 2D, respectivamente. Já no espectro obtido do biossensor de PTB-GOx, foi observado o aparecimento de inúmeras bandas adicionais, as quais são relacionadas ao PTB e a GOx, sendo as principais indicadas na Figura 71A e a descrição completa com suas respectivas atribuições listadas na Tabela 9.⁴⁴⁴⁻⁴⁴⁷

Figura 71. (A) Espectros Raman obtidos da superfície do eletrodo de grafite e do biossensor de PTB-GOx. (B) Mapeamento Raman da superfície do biossensor de PTB-GOx para a faixa entre 440 - 515 cm^{-1} .



FONTE: O autor (2018).

A presença de GOx na superfície do biossensor também foi confirmada pela elevação da linha base no espectro Raman correspondente ao biossensor de PTB-GOx, devido ao efeito de fluorescência que foi gerado pelo dinucleótido de flavina e adenina (FAD), responsável pela atividade redox da GOx.⁴⁴⁸ Por fim, foi realizado um mapeamento Raman da superfície do biossensor de PTB-GOx na faixa entre 440-515 cm^{-1} (Figura 71B), sendo observada a presença de sinal correspondente a esta banda ao longo de toda a superfície analisada, confirmando assim a deposição homogênea de PTB na superfície do eletrodo de grafite.

Tabela 9. Atribuições das bandas Raman para o grafite, PTB e GOx.

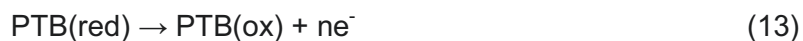
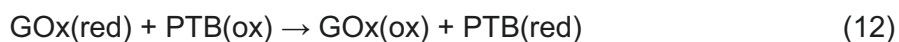
Número de onda (cm^{-1})			Atribuição
Grafite	GOx	PTB	
1315		455	$\nu(\text{C-S}) + \nu(\text{CC})$ anel-III
		500	$\nu(\text{C-S}) + \nu(\text{C-N})$ (respiração do anel central) + balanço (NH_2)
		630	$\gamma(\text{CC})$ anel-III
		762-778	$\nu(\text{CC})$ anel-I respiração
		882	$\nu(\text{CC})$ anel-III + $\nu_{as}(\text{C-N-C}) + \nu_{as}(\text{C-S-C})$
		995	$\nu_{as}(\text{C-S-C}) + \nu(\text{CC})$ anel-I + $\beta(\text{CH})$ anel-III + balanço(NH_2) + abano (CH_3)
		1032	$\beta(\text{CH})$ anel-III + $\nu_{as}(\text{C-S-C}) + \text{balanço}(\text{NH}_2)$
		1150	$\beta(\text{CH}) + \beta(\text{CH})$ anel-III
			$\nu(\text{C-C})$ banda D
		1323	$\nu(\text{CC})$ anel-III + $\nu_{as}(\text{C-N-C}) + \beta(\text{CH})$ anel-III + balanço(NH_2)
1570	1342		$\nu(\text{C-C=N}) + \nu_{as}(\text{C=C}) + \delta(\text{CH}_3)$
	1400		$\nu(\text{N-C=O}) + \nu(\text{C=C}) + \nu(\text{C-C})$
		1503	$\nu(\text{CC})$ anel-I + $\delta(\text{C-N-H}) + \nu(\text{N-C})$
			$\nu(\text{C-C})$ (banda G)
2640		1620	$\nu(\text{CC})$ anel-III + $\nu(\text{CC})$ anel-I + $\delta(\text{NH}_2) + \nu_{as}(\text{C-N-C})$
			$\nu(\text{C-C})$ banda 2D

Abreviações – ν : estiramento, δ : deformação, β : deformação no plano, γ : deformação fora do plano.

FONTES: Referências 444-447.

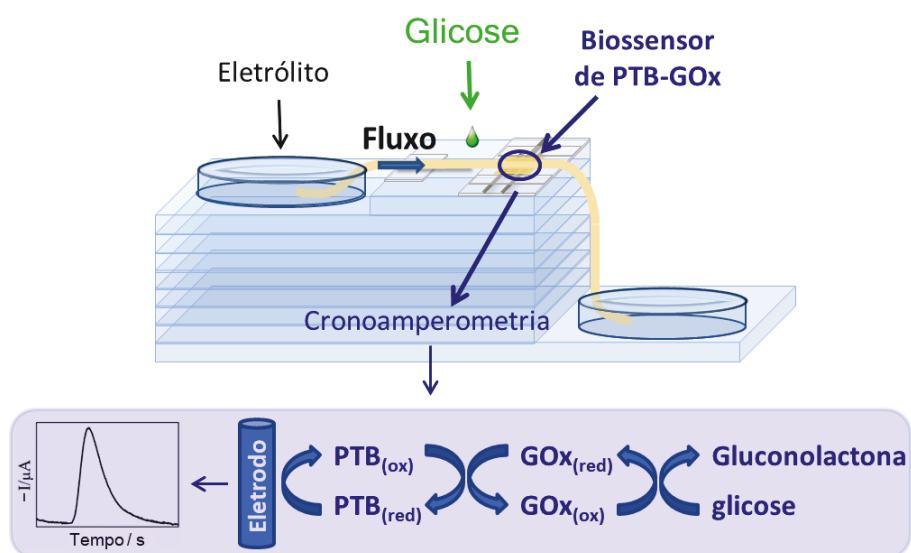
4.3.3 Avaliação da resposta eletroquímica para glicose

O mecanismo de determinação da glicose pelo biossensor de PTB-GOx baseou-se na interação do analito com o sítio ativo da GOx (sem a participação do oxigênio), provocando a redução da enzima, com a posterior transferência dos elétrons para o PTB e em seguida para a superfície do eletrodo,^{443,449} conforme mostrado nas reações abaixo:



Desta forma, as medidas de glicose no $\mu\text{TED-3}$ foram realizadas por μFIA (com a injeção do analito diretamente no canal microfluídico do dispositivo) com detecção por cronoamperometria, sendo a resposta do analito obtida na forma de uma diminuição dos valores negativos da corrente catódica (devido ao potencial negativo aplicado na medida) gerada pelo filme de PTB (Figura 72).

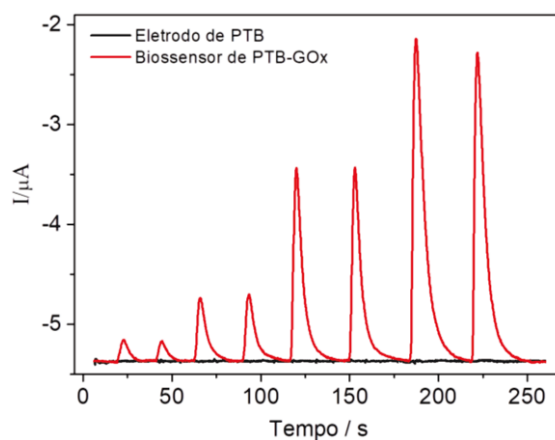
Figura 72. Mecanismo de detecção de glicose no biossensor de PTB-GOx integrado ao $\mu\text{TED-3}$.



FONTE: O autor (2018).

Assim, para comprovar a função do PTB e da GOx na determinação de glicose no $\mu\text{TED-3}$, análises cronoamperométricas foram realizadas em eletrodo construído apenas com o filme de PTB e no biossensor contendo PTB e GOx, com injeções de soluções de glicose com concentrações entre 1,0 e 25,0 mmol L⁻¹. Para o eletrodo contendo apenas o filme de PTB, não foi observada nenhuma resposta em todas as concentrações do analito injetadas (linha preta na Figura 73). Já para o biossensor de PTB-GOx, foram obtidos sinais transientes bem definidos e intensos (linha vermelha na Figura 73), comprovando que a determinação da glicose com o biossensor de PTB-GOx ocorre exclusivamente pela interação do analito com o sitio ativo da enzima GOx. Além disso, é possível observar na Figura 73, que a resposta cronoamperométrica para a detecção de glicose é obtida na forma de uma diminuição dos valores negativos da corrente catódica gerada pelo filme de PTB, como descrito nas reações 11, 12 e 13 e na Figura 72.

Figura 73. Respostas cronoamperométricas obtidas com eletrodo de PTB (linha preta) e biossensor de PTB-GOx (linha vermelha) para injeções de glicose entre 1,0 e 25,0 mmol L⁻¹. Potencial aplicado: -0,55 V; eletrólito de suporte: PB 0,10 mol L⁻¹ pH 7,4; volume de injeção: 2,0 µL.



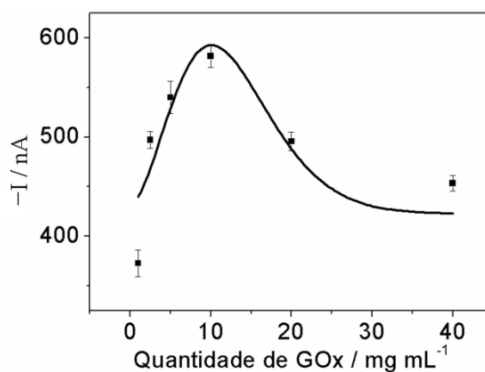
FONTE: O autor (2018).

4.3.4 Avaliação e otimização das condições experimentais

Os parâmetros analíticos relacionados ao preparo do biossensor de PTB-GOx e a detecção eletroquímica foram avaliados e os melhores valores selecionados de modo a obter um bom desempenho analítico com alta sensibilidade, rapidez e estabilidade nas análises de glicose. Em todos os estudos de otimização, a resposta do biossensor de PTB-GOx integrado ao µTED-3 foi monitorada empregando uma solução de 2,50 mmol L⁻¹ de glicose e PB 0,10 mol L⁻¹ pH 7,4 como eletrólito de suporte.

Inicialmente, foi avaliado o efeito da quantidade de GOx empregada no preparo do biossensor de PTB-GOx para a detecção eletroquímica de glicose. Desta forma, biossensores foram construídos utilizando soluções contendo entre 1,0 e 40,0 mg mL⁻¹ de GOx, além de 5,0 mmol L⁻¹ de TB. Foi observada uma melhora na resposta eletroquímica da glicose com uma presença maior de GOx na solução de preparo do biossensor, com a obtenção de um valor máximo de corrente do analito com 10,0 mg mL⁻¹ de GOx (Figura 74) e uma diminuição no sinal da glicose para biossensores preparados com 20,0 e 40,0 mg mL⁻¹ de GOx. Esse comportamento é explicado pela significativa diminuição na condutividade elétrica da superfície do biossensor quando grandes quantidades de GOx são imobilizadas, mesmo que o filme de PTB-GOx contenha um número maior de sítios ativos para o analito. Desta forma, uma solução contendo 10,0 mg mL⁻¹ de GOx (valor que concorda com outros trabalhos que também construíram biossensores enzimáticos^{450,451}) e 5,0 mmol L⁻¹ de TB foi selecionada para a fabricação dos biossensores de PTB-GOx utilizados nos estudos posteriores.

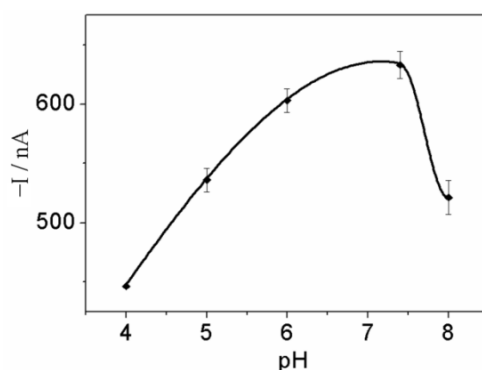
Figura 74. Influência da quantidade de GOx utilizada na solução de preparo do biossensor de PTB-GOx na resposta eletroquímica para $2,50 \text{ mmol L}^{-1}$ de glicose. Potencial aplicado: $-0,55 \text{ V}$; eletrólito de suporte: PB $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,4; volume de injeção: $2,0 \text{ }\mu\text{L}$.



FONTE: O autor (2018).

Outro parâmetro estudado e otimizado foi o pH da solução de TB e GOx utilizada na etapa de eletropolimerização. Biossensores foram preparados a partir de soluções contendo $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de TB e $10,0 \text{ mg mL}^{-1}$ de GOx ajustados com valores de pH entre 4,0 e 8,0. Na resposta eletroquímica para glicose, foi observado um aumento progressivo nos valores de corrente com a utilização de biossensores preparados em solução de TB e GOx com pHs de 4,0 para 7,4 (Figura 75) e uma diminuição no sinal para o biossensor fabricado com pH 8,0, o que se deve ao início do processo de desnaturação da enzima neste pH. Assim, para os estudos subsequentes, uma solução de TB e GOx com pH 7,4 foi selecionada para o preparo dos biossensores, valor do pH fisiológico do corpo humano e que preserva a atividade da GOx.⁴⁵²

Figura 75. Efeito do pH de preparo do biossensor de PTB-GOx nas respostas cronoamperométricas para $2,50 \text{ mmol L}^{-1}$ de glicose. Potencial aplicado: $-0,55 \text{ V}$; eletrólito de suporte: PB $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,4; volume de injeção: $2,0 \text{ }\mu\text{L}$.

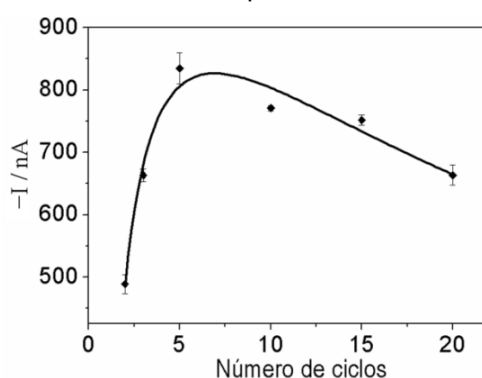


FONTE: O autor (2018).

Posteriormente, foi avaliada a influência da espessura do filme de PTB-GOx depositada no biossensor, o qual é controlado pelo número de ciclos voltamétricos aplicados durante a etapa de eletropolimerização. Desta forma, foram avaliados biossensores contendo filmes de PTB-GOx construídos por 1 a 20 ciclos de CV (entre -

0,60 e 0,70 V) com uma solução contendo $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de TB e $10,0 \text{ mg mL}^{-1}$ de GOx. Foi observado um aumento rápido na corrente para a glicose nos biossensores fabricados entre 1 e 5 ciclos (Figura 76) e uma diminuição na resposta dos biossensores preparados com 10 e 20 ciclos, comportamento que é explicado pela dificuldade na difusão das espécies na superfície do eletrodo devido a grande espessura dos filmes (com 10 e 20 ciclos de CV).⁴⁴³ Assim, devido a melhor resposta e preparação mais rápida, para a sequência de trabalho, foram adotados 5 ciclos voltamétricos para a eletropolimerização de PTB e GOx no biossensor.

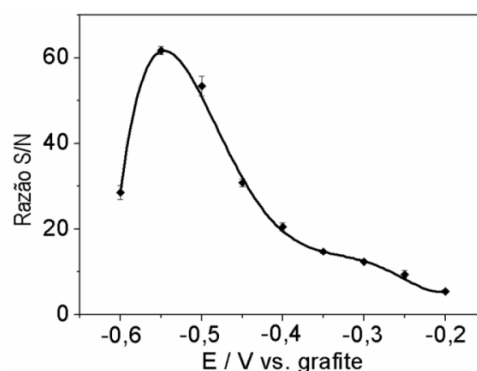
Figura 76. Variação de corrente para $2,50 \text{ mmol L}^{-1}$ de glicose com o número de ciclos de CV utilizados no preparo dos biossensores de PTB-GOx. Potencial aplicado: $-0,55 \text{ V}$; eletrólito de suporte: PB $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,4; volume de injeção: $2,0 \text{ }\mu\text{L}$.



FONTE: O autor (2018).

Por fim, foi investigada a influência do potencial aplicado para a determinação da glicose, utilizando biossensores preparados pela eletropolimerização de uma solução (em PB pH 7,4) contendo $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de TB e $10,0 \text{ mg mL}^{-1}$ de GOx. Neste estudo, novamente foi utilizada a razão S/N para compensar as variações dos valores de corrente da linha base. A medida que o potencial tornou-se mais negativo, a razão S/N aumentou, até alcançar um máximo em $-0,55 \text{ V}$ e decrescer em $-0,60 \text{ V}$ (Figura 77). Assim, para os próximos estudos, foi selecionado um potencial de detecção de $-0,55 \text{ V}$

Figura 77. Efeito do potencial aplicado na determinação de $2,50 \text{ mmol L}^{-1}$ de glicose com o $\mu\text{TED-3}$. Eletrólito de suporte: PB $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,4; volume de injeção: $2,0 \text{ }\mu\text{L}$.



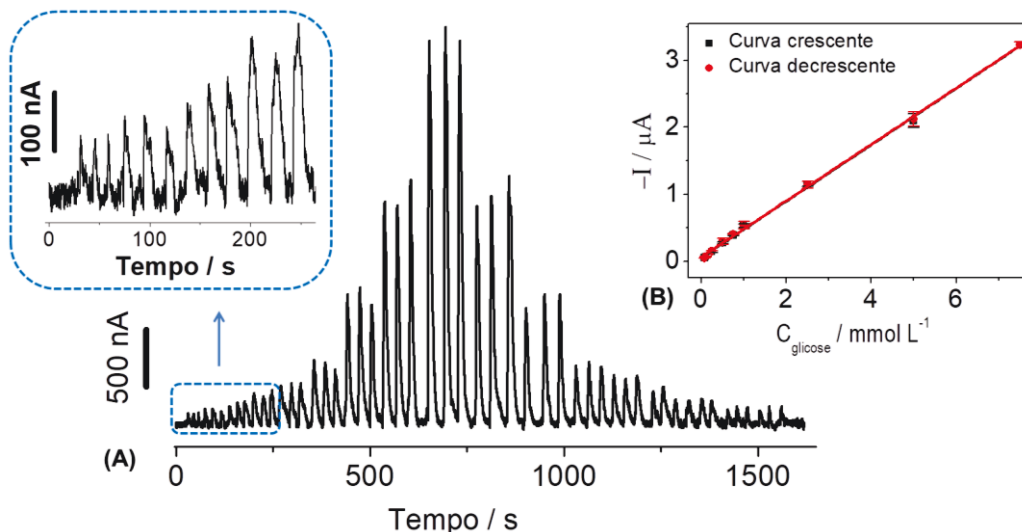
FONTE: O autor (2018).

4.3.5 Desempenho analítico do μ TED-3 para a determinação de glicose

Em condições otimizadas, as características analíticas do μ TED-3 foram avaliadas através da realização de diversos estudos. Inicialmente, foi construída uma curva de calibração através da determinação cronoamperométrica de glicose para injeções (em triplicata) de soluções do analito com concentrações entre 0,075 e 7,5 mmol L⁻¹ (Figura 78A). Observando os valores de corrente obtidos a partir dos sinais transientes referentes as injeções de glicose, o biossensor de PTB-GOx integrado ao μ TED-3 apresentou uma resposta linear para a faixa estudada (0,075 a 7,5 mmol L⁻¹ de glicose, a qual compreende os níveis de glicose normalmente encontrados na lágrima de pessoas diabéticas e não diabéticas), com a obtenção da seguinte equação de regressão linear:

$$I(\text{nA}) = -57,21 (\text{nA}) + 421,16 C_{\text{glicose}} (\text{mmol L}^{-1}) \quad (R^2 = 0,9987) \quad (14)$$

Figura 78. (A) Sinais transientes obtidos para injeções ($n = 3$) de soluções de glicose com concentrações entre 0,075 e 7,5 mmol L⁻¹ empregando o biossensor de PTB-GOx integrado ao μ TED-3. No detalhe, os sinais transientes das quatro menores concentrações de glicose injetadas (0,075 – 0,5 mmol L⁻¹). Potencial aplicado: -0,55 V; eletrólito de suporte: PB 0,10 mol L⁻¹ pH 7,4; volume de injeção: 2,0 μ L. (B) Curvas de calibração construídas com os valores de corrente obtidos em A.



FORNE: O autor (2018).

Foi observada também uma excelente correlação (99,92%) entre as sensibilidades das curvas correspondentes as injeções das concentrações crescentes (421,33 nA L mmol⁻¹) e decrescentes (421,00 nA L mmol⁻¹) de glicose (Figura 78B), indicando a ausência de lixiviação do filme de PTB-GOx da superfície do biossensor e a estabilidade da atividade enzimática durante a análise.

A partir dos dados da curva de calibração, foram calculados o LD e LQ (utilizando as equações 7 e 8 da página 103) para as determinações de glicose com o biossensor de PTB-GOx integrado ao μ TED-3, sendo obtidos valores de $22,2 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $74,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente. Assim, o desempenho analítico do dispositivo proposto nesta parte do trabalho apresentou uma faixa linear e um valor de LD semelhante ou em alguns casos melhor, quando comparado a outros trabalhos que também utilizaram biossensores integrados a dispositivos em miniatura para a determinação amperométrica de glicose (Tabela 10).

Tabela 10. Comparação do desempenho analítico do μ TED-3/biossensor de PTB-GOx com outros biossensores relatados na literatura para a determinação eletroquímica de glicose.

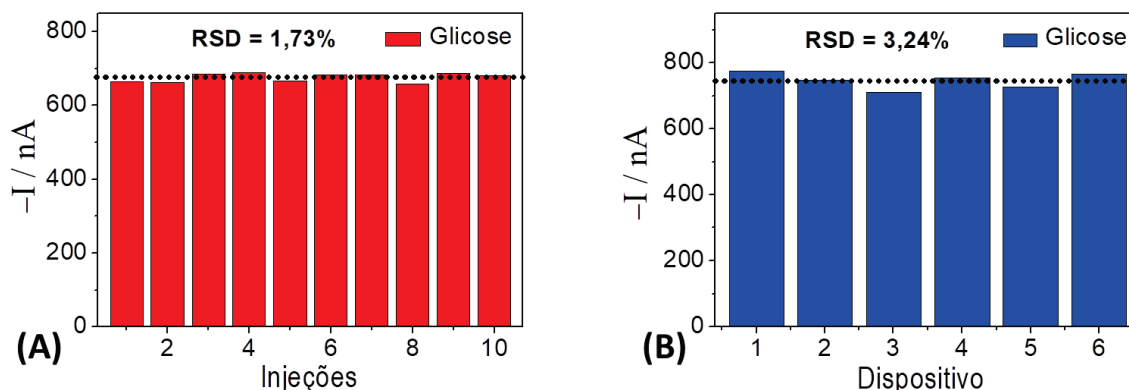
Eletrodo	Faixa linear ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	LD ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Referência
Microeletrodo Pt- <i>black</i> -GOx	200,0 – 43500,0	50,0	453
(GOx)-CNT-AuNWAs	100,0 – 3000,0	20,0	454
GOx/PtNPs-SPE	500,0 – 3000,0	9,3	455
Eletrodo de Au/GOx	5,0 – 2000,0	4,1	430
Ru-PVPAA/GOx/GCE	0,0 – 10000,0	290,0	456
Nanopilares de ouro PPy/GOx	250,0 – 2500,0	15,0	457
Eletrodo em prego/GOx	50,0 – 1000,0	30,0	458
Biossensor de PTB-GOx	75,0 – 7500,0	22,2	Este trabalho

Abreviaturas: Microeletrodo Pt-*black*-GOx – Microeletrodo de Pt-*black* contendo glicose oxidase. (GOx)-CNT-AuNWAs – Eletrodo composto por matriz de nanofios de ouro modificado com nanotubos de carbono e glicose oxidase. GOx/PtNPs-SPE - Eletrodo impresso modificado com glicose oxidase e nanopartículas de platina. Eletrodo de Au/GOx – Eletrodo de filme de ouro modificado com glicose oxidase. Ru-RP/GOx/GCE – Eletrodo de carbono vítreo modificado com poli (vinilpiridina-co-acrilamida), rutênio e glicose oxidase. Nanopilares de ouro PPy/GOx – Eletrodo composto por nanopilares de ouro modificado com polipirrol e glicose oxidase. Eletrodo em prego/GOx – Eletrodo baseado em pregos contendo glicose oxidase.

FONTE: O autor (2018). Valores obtidos das referências 430, 453-458.

Para a avaliação da estabilidade nas medidas realizadas com o μ TED-3 contendo o biossensor de PTB-GOx, análises cronoamperométricas foram realizadas em uma solução de $2,50 \text{ mmol L}^{-1}$ de glicose para injeções em um mesmo dispositivo (repetibilidade) e em dispositivos diferentes (reprodutibilidade). No estudo de repetibilidade, foi obtido um RSD de 1,73% para 10 injeções consecutivas de glicose (Figura 79A) e para o estudo de reprodutibilidade, as análises realizadas em 6 dispositivos diferentes apresentaram um RSD de 3,24% (Figura 79B). Assim, os baixos valores de RSD mostraram a ausência de oscilações nas medidas em fluxo para a glicose e um bom controle nos parâmetros envolvidos no processo de preparo do biossensor de PTB-GOx e de todo o μ TED-3. Além disso, os sinais transientes mostraram uma resposta rápida para a glicose e um curto tempo de limpeza, permitindo uma nova injeção da amostra a cada 20 s.

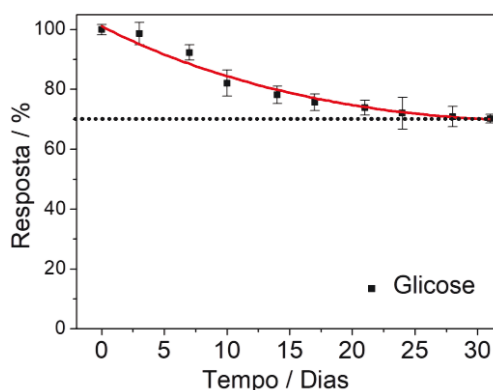
Figura 79. Valores de corrente e RSDs obtidos para o estudo de (A) repetibilidade e (B) reprodutibilidade na determinação de glicose com μ TED-3. Potencial aplicado: -0,55 V; eletrólito de suporte: PB 0,10 mol L⁻¹ pH 7,4; volume de injeção: 2,0 μ L.



FONTE: O autor (2018).

Também foi avaliada a estabilidade na resposta do biossensor de PTB-GOx para longos períodos de uso (medidas por vários dias consecutivos). Para isso, análises em fluxo de uma solução de glicose 1,0 mmol L⁻¹ foram realizadas durante 31 dias, com a utilização do mesmo biossensor de PTB-GOx (integrado ao μ TED-3) durante 1 h a cada dia de análise e com armazenando em PB a 4 °C entre os intervalos das medidas. Foi observada uma queda leve e progressiva na resposta do biossensor para a detecção de glicose ao longo dos dias, o qual manteve 70% da resposta inicial após o 31º dia de medida (Figura 80), indicando assim que a eletropolimerização do PTB reduz a desnaturação da GOx e evita a perda do filme imobilizado na superfície do eletrodo durante as análises em fluxo. Assim, mesmo com uma redução de 30% na resposta ao longo de 1 mês, a sensibilidade apresentada pelo dispositivo para as análises de glicose permite o uso do biossensor por longos períodos, requerendo apenas a realização de uma calibração prévia.

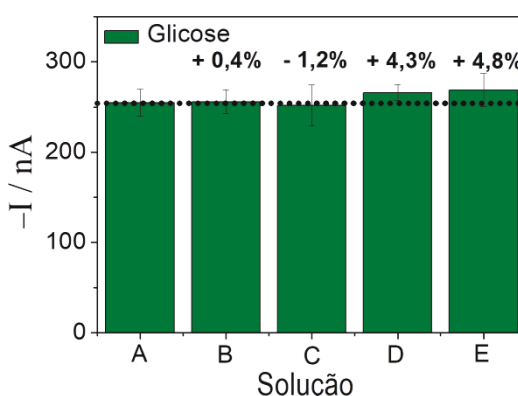
Figura 80. Estabilidade da resposta do biossensor de PTB-GOx integrado ao μ TED-3 para as determinações de glicose ao longo de 31 dias. Potencial aplicado: -0,55 V; eletrólito de suporte: PB 0,10 mol L⁻¹ pH 7,4; volume de injeção: 2,0 μ L.



FONTE: O autor (2018).

Por fim, para uma determinação precisa dos níveis de glicose na lágrima, é necessário que as outras espécies presentes neste fluido não apresentem influência nos resultados. Por isso, a seletividade do biossensor de PTB-GOx foi avaliada para a determinação de soluções de $0,50 \text{ mmol L}^{-1}$ de glicose contendo $10,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de lactato, $10,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de ureia e/ou $50,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de ácido ascórbico, as quais são as principais espécies e concentrações encontradas na lágrima e potencialmente interferentes na detecção de glicose.³³⁵ Não foram observadas interferências significativas nas respostas do biossensor para a glicose (variação inferior a $\pm 5\%$), tanto na avaliação individual como na avaliação conjunta do analito com lactato, ureia e ácido ascórbico (Figura 81). Desta forma, o biossensor de PTB-GOx mostrou uma alta seletividade para a glicose e potencial para ser empregado na determinação deste biomarcador na lágrima.

Figura 81. Efeito das espécies potencialmente interferentes nas respostas obtidas com o biossensor de PTB-GOx para a glicose. As análises foram realizadas com as seguintes soluções: (A) apenas $0,50 \text{ mmol L}^{-1}$ de glicose; (B) $0,50 \text{ mmol L}^{-1}$ de glicose + $10,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de lactato; (C) $0,50 \text{ mmol L}^{-1}$ de glicose + $10,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de ureia; (D) $0,50 \text{ mmol L}^{-1}$ de glicose + $50,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de ácido ascórbico; (E) $0,50 \text{ mmol L}^{-1}$ de glicose + $10,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de lactato + $10,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de ureia + $50,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de ácido ascórbico. Potencial aplicado: $-0,55 \text{ V}$; eletrólito de suporte: PB $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,4; volume de injeção: $2,0 \text{ } \mu\text{L}$.



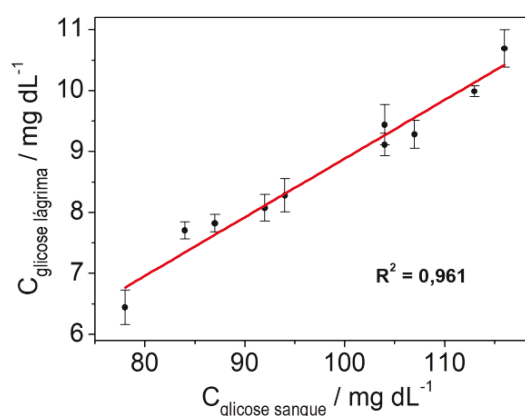
FONTE: O autor (2018).

4.3.6 Determinação dos níveis de glicose em lágrima e sangue

As determinações de glicose na lágrima de 10 voluntários não diabéticos foram realizadas com o biossensor de PTB-GOx integrado ao $\mu\text{TED-3}$ com detecção por cronoamperometria. As concentrações do analito obtidas ficaram entre $0,36$ e $0,59 \text{ mmol L}^{-1}$, valores que concordam com os níveis (entre $0,10$ e $0,60 \text{ mmol L}^{-1}$) normalmente relatados na literatura para a lágrima.⁴⁵⁹ Além disso, a concentração de glicose no sangue de cada voluntário foi determinada com um medidor comercial portátil, sendo na sequência construído um gráfico para a avaliação da correlação dos resultados das análises de glicose na lágrima e no sangue (Figura 82). Através da regressão linear dos

dados, foi encontrado um valor de R^2 de 0,961 e uma razão média dos níveis deste biomarcador na lágrima e no sangue de $0,096 \pm 0,006$, mostrando uma forte correlação entre os dois fluidos e uma proporção similar aos valores descritos na literatura, os quais relatam níveis de glicose 10 vezes menores na lágrima em relação ao sangue.^{318,460} Além disso, os resultados confirmaram a possibilidade no emprego da lágrima para um monitoramento menos invasivo dos níveis de glicose (em substituição ao sangue) e a potencialidade do μ TED-3 em ser aplicado em análises de amostras reais.

Figura 82. Gráfico de correlação entre os níveis de glicose medidos em lágrima e no sangue de 10 voluntários não-diabéticos.



FONTE: O autor (2018).

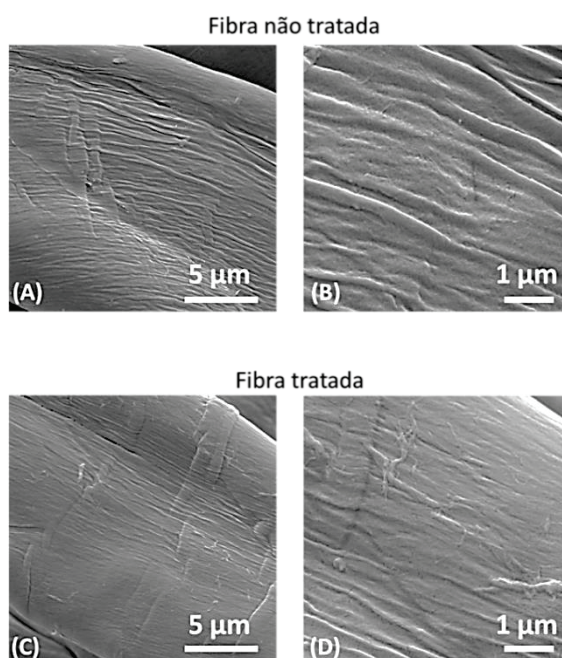
4.4 PARTE IV – μ TED-4

Nesta quarta parte do projeto, foi realizada a construção, caracterização e otimização de um μ TED com o objetivo de efetuar separações cromatográficas no próprio canal microfluídico do dispositivo, com posterior detecção das espécies por cronoamperometria. As separações foram baseadas no mecanismo de troca iônica dos compostos com os fios de algodão (que compõe o canal microfluídico) contendo grupos carboxílicos. Além disso, os eletrodos responsáveis pelas detecções eletroquímicas também foram construídos diretamente sobre os fios de algodão do canal microfluídico. Para a avaliação e otimização dos parâmetros relacionados a separação e detecção, foram utilizadas misturas de AA e DA, com o μ TED-4 sendo posteriormente aplicado na determinação destas espécies em amostras de lágrimas. Por fim, o custo do dispositivo construído nesta parte do trabalho foi de 4,37 reais, valor superior aos μ TEDs anteriores devido a utilização de eletrodos de Au e tinta condutora de carbono, porém, extremamente baixo considerando a sua capacidade de realizar separações cromatográficas integradas no canal microfluídico do dispositivo, visto o alto custo dos sistemas cromatográficos tradicionais.

4.4.1 Avaliação do tratamento nos fios de algodão

A realização de separações cromatográficas de compostos pelo mecanismo de troca iônica depende da eficiência na incorporação de grupos funcionais (por exemplo, grupos carboxílicos) na superfície dos fios de algodão e na manutenção de suas características básicas para a realização de ensaios microfluídicos, tais como caráter hidrofílico, flexibilidade, alta resistência mecânica, entre outros. Desta forma, análises de MEV foram realizadas nos fios de algodão antes e após o tratamento com ácido cítrico de modo a avaliar possíveis alterações na superfície do material. De acordo com as micrografias de MEV obtidas, não foram observadas alterações morfológicas nas fibras de algodão (Figura 83), como a possível deformação da superfície ou a formação de rachaduras ou poros. Além disso, durante o manuseio dos fios tratados para a construção dos dispositivos, foi observado que eles mantiveram sua flexibilidade e sua resistência mecânica.

Figura 83. Micrografias representativas de MEV com elétrons secundários da superfície de uma fibra de algodão (A-B) não tratada e (C-D) tratada com ácido cítrico.

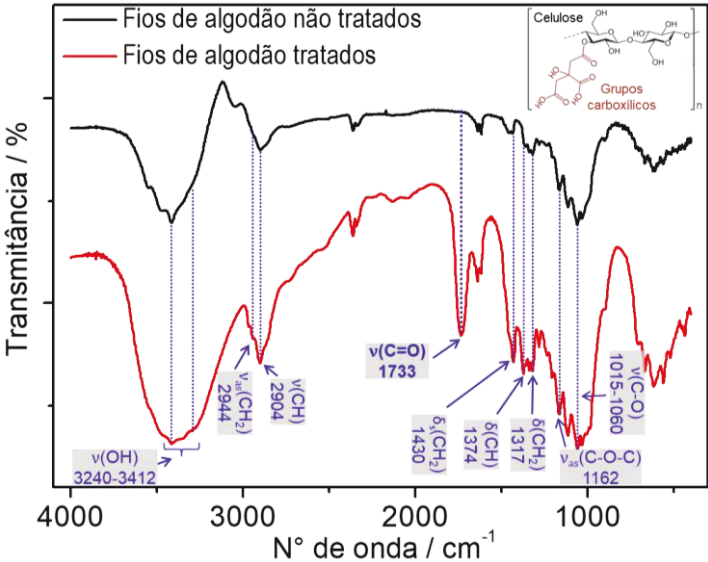


FONTE: O autor (2018).

Foram realizadas também caracterizações por FTIR e Raman para avaliar o processo de incorporação de grupos carboxílicos na superfície dos fios de algodão através do tratamento com ácido cítrico. Nas análises de FTIR, é possível observar, além das bandas características da celulose^{398,418,461} (com as principais sendo mostradas na Figura 84 e a relação completa, incluindo as atribuições, descritas na Tabela 11), o surgimento de uma nova banda em 1733 cm^{-1} no espectro correspondente ao fio de

algodão tratado, a qual é atribuída ao estiramento do grupo carbonila,^{419,462,463} indicando assim a eficiência no tratamento dos fios de algodão através do processo de esterificação com ácido cítrico e a incorporação de grupos carboxílicos na estrutura da celulose.

Figura 84. Espectros de FTIR obtidos dos fios de algodão não tratados e tratados pelo processo de esterificação com ácido cítrico. Os números de onda e as atribuições das principais bandas também são indicadas.



FONTE: O autor (2018).

Tabela 11. Bandas de absorção no infravermelho e atribuições correspondentes observadas nos fios de algodão antes e após o tratamento com ácido cítrico.

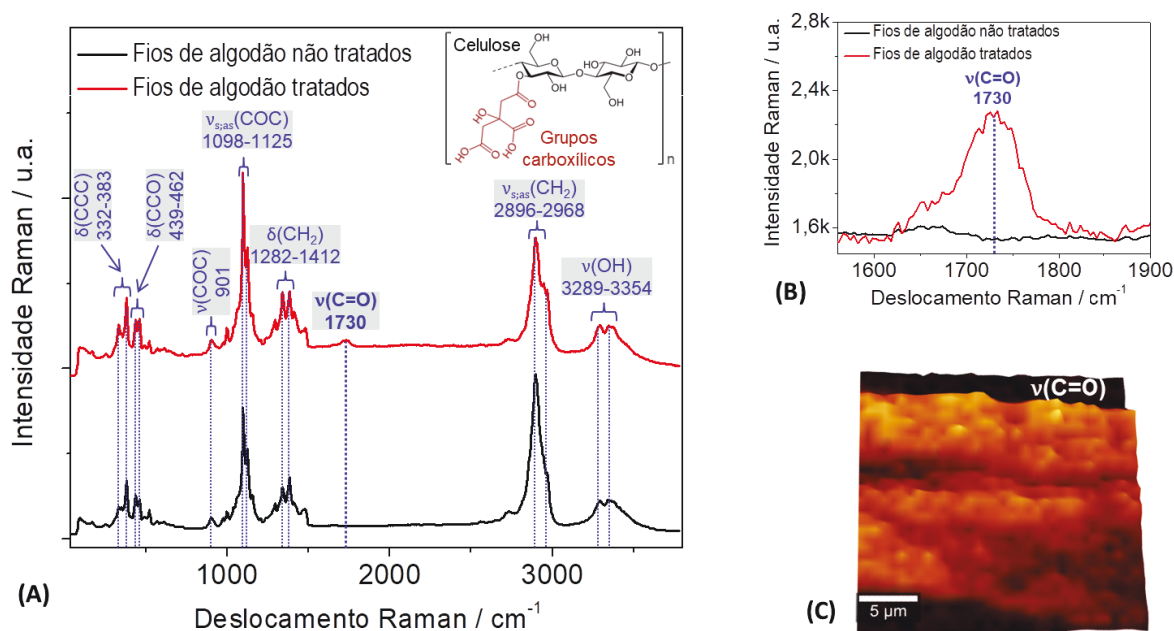
Número de onda (cm ⁻¹)	Atribuição
1000	v(C-O)
1015-1060	v(C-O)
1110-1125	v _{as} (Anel) em fase
1162	v _{as} (C-O-C)
1205	δ(OH) no plano
1317	δ(CH ₂) torção, no plano
1336	δ(OH) no plano
1374	δ(CH)
1430	δ _s (CH ₂)
1635	H ₂ O absorvida
1733	v(C= O)
2904	v(CH)
2944	v _{as} (CH ₂)
3240-3412	v(OH)

Abreviações – v: estiramento, δ: deformação.

FONTE: Referências 398, 418 e 461.

Comportamento semelhante às medidas de FTIR foi obtido nas análises Raman, com a observação das bandas características da celulose nos fios tratados e não tratados (Figura 85A e Tabela 5 da página 107) e o aparecimento de uma banda em 1730 cm^{-1} correspondente ao estiramento da carbonila⁴¹⁹ (em detalhe na Figura 85B) para a análise realizada nos fios de algodão tratados com ácido cítrico. Além disso, foi realizado um mapeamento de Raman de uma fibra de algodão tratada usando a faixa entre 1650 a 1780 cm^{-1} , a qual compreende a banda correspondente a carbonila (centro em 1730 cm^{-1}), sendo observada a presença desta banda ao longo de toda a superfície analisada (Figura 85C), indicando assim uma incorporação homogênea dos grupos carboxílicos na superfície dos fios de algodão.

Figura 85. Espectros Raman obtido dos fios de algodão antes e após o tratamento com ácido cítrico, mostrando (A) os espectros completos (faixa entre 40 e 3800 cm^{-1}) e (B) apenas a região que compreende o estiramento do grupo carbonila. (C) Mapeamento Raman da faixa de estiramento do grupo carbonila presentes numa fibra de algodão tratada.



FONTE: O autor (2018).

Por fim, os grupos carboxílicos foram quantificados através de metodologia³⁹² baseada em titulação complexométrica do cálcio remanescente (após contato com os fios de algodão tratados), levando em consideração a seguinte reação do acetato de cálcio com os grupos carboxílicos:



Além disso, para o cálculo da quantidade de grupos carboxílicos, foi empregada a equação abaixo:

$$\text{COOH} \left(\text{mmol kg}^{-1} \right) = \frac{(V_{eqb} - V_{eqa})C \times 1000}{m} \quad (16)$$

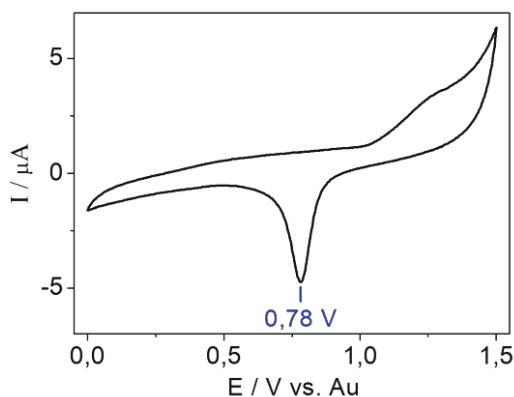
onde V_{eqa} e V_{eqb} são os volumes de EDTA consumidos nas titulações da solução de Ca remanescente (após 24 horas de agitação com os fios de algodão) e da solução de Ca utilizada como prova em branco, respectivamente, C é a concentração do EDTA utilizado na titulação e m é massa dos fios de algodão pesados e misturados com a solução de acetato de cálcio. Desta forma, a titulação complexométrica com EDTA indicou a presença de $137 \pm 25 \text{ mmol kg}^{-1}$ de grupos carboxílicos nos fios de algodão que passaram pelo tratamento com ácido cítrico, valor superior ao relatado para o papel cromatográfico Whatman 4 ($32 \pm 19 \text{ mmol kg}^{-1}$) e comparável ao papel cromatográfico VWR ($134 \pm 24 \text{ mmol kg}^{-1}$),³⁹² o qual possui uma elevada capacidade de troca iônica.

Assim, as caracterizações acima indicaram uma grande eficiência na incorporação de grupos carboxílicos com o emprego do processo de esterificação da celulose com ácido cítrico, mantendo importantes características do material como flexibilidade e resistência mecânica, possibilitando assim, a utilização dos fios de algodão tratados na montagem do canal microfluídico do $\mu\text{TED-4}$ e a realização de separações cromatográficas por troca iônica neste dispositivo.

4.4.2 Caracterização eletroquímica dos eletrodos de ouro

Análises de CV foram realizadas nos eletrodos de Au construídos no canal microfluídico do $\mu\text{TED-4}$ para avaliar as características destes eletrodos e o comportamento eletroquímico dos analitos (AA e DA) neste sistema. Inicialmente, foi realizada a estimativa da área eletroativa do WE, através da obtenção de um CV (entre 0,00 e 1,50 V vs. ouro) em uma solução de H_2SO_4 $0,50 \text{ mol L}^{-1}$ (Figura 86). Foi observado um perfil voltamétrico característico do Au, com um intenso pico de redução em 0,78 V, o qual foi utilizado para a estimativa da área eletroativa do eletrodo. Considerando uma carga específica de $400,0 \text{ } \mu\text{C cm}^{-2}$ para a redução do ouro,⁴⁶⁴ foi obtida uma área eletroativa de $0,17 \text{ cm}^2$ para o WE do $\mu\text{TED-4}$, indicando um eficiente recobrimento com Au das fibras externas do canal microfluídico e parte das fibras internas, visto que a área geométrica externa estimada do eletrodo (considerando o eletrodo como um cilindro) era de $0,05 \text{ cm}^2$.

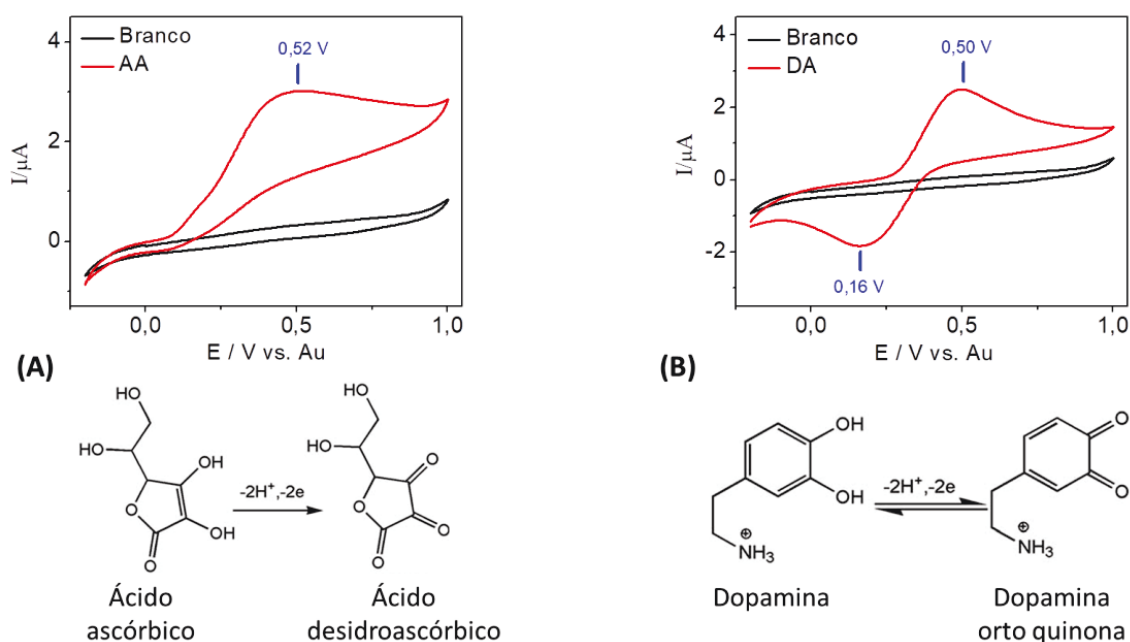
Figura 86. CV obtido em H_2SO_4 $0,50 \text{ mol L}^{-1}$ com os eletrodos de Au construídos no canal microfluídico do $\mu\text{TED-4}$. Velocidade de varredura: 50 mV s^{-1} .



FONTE: O autor (2018).

Na sequência, foi realizada a avaliação do comportamento eletroquímico do AA e DA nos eletrodos de Au, sendo utilizado como eletrólito de suporte tampão acetato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ pH 3,8, com as CVs obtidas na faixa entre $-0,20$ e $1,00 \text{ V}$ vs. ouro para os analitos individuais ou para a mistura deles, além da análise apenas do eletrólito de suporte (como prova em branco). Nos CVs realizados na ausência dos analitos, não foi observado nenhum processo faradaico (linhas pretas na Figura 87).

Figura 87. Análises de CV realizadas no $\mu\text{TED-4}$ com eletrodos de Au para o eletrólito de suporte (provas em branco) e para (A) $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de AA ou (B) $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de DA. As reações eletroquímicas correspondentes ao AA e DA também são mostradas. Eletrólito de suporte: tampão acetato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ pH 3,8; velocidade de varredura: 50 mV s^{-1} .

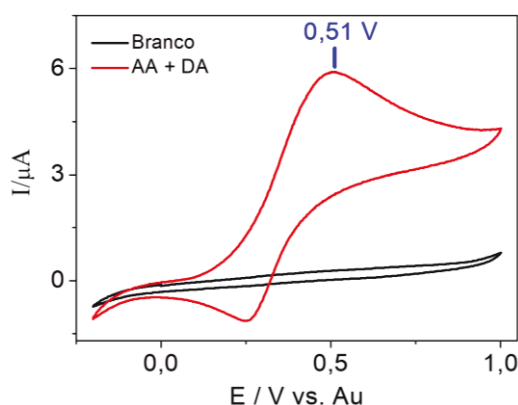


FONTE: O autor (2018). Reações adaptadas da referência 465.

Para o CV obtido com $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de AA, ocorreu a geração de apenas um processo de oxidação em $0,52 \text{ V}$, o qual corresponde a formação do ácido desidroascórbico através da perda de $2e^-$ e $2H^+$ (Figura 87A).^{465,466} Já a análise de CV de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de DA apresentou um processo redox envolvendo a transferência de $2e^-$ e $2H^+$, com a oxidação da DA em $0,50 \text{ V}$ no sentido anódico da varredura para a formação da dopamina orto quinona e posterior regeneração da DA no sentido catódico em $0,16 \text{ V}$ (Figura 87B).⁴⁶⁷

As análises individuais de CV dos analitos mostraram potenciais de oxidação muito próximos ($0,52 \text{ V}$ para o AA e $0,50 \text{ V}$ para o DA), sugerindo uma dificuldade na detecção eletroquímica direta da mistura dos compostos nos eletrodos de Au. Para a confirmação desta observação, análises de CV (entre $-0,20$ e $1,00 \text{ V}$) foram realizadas apenas do eletrólito (prova em branco) e da mistura de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ AA + $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ DA. O CV do eletrólito não mostrou nenhum processo de oxidação do Au (Figura 88), o que poderia comprometer a estabilidade dos eletrodos e também confundir com a resposta dos analitos. Já o CV correspondente a mistura de AA e DA mostrou a formação de apenas uma onda voltamétrica em $0,51 \text{ V}$ correspondente a sobreposição dos processos de oxidação dos analitos, confirmando assim a incapacidade dos eletrodos de Au depositados no canal do $\mu\text{TED-4}$ na determinação voltamétrica seletiva do AA e DA a partir da mistura dos analitos e indicando a necessidade da separação cromatográfica dos compostos antes da detecção eletroquímica.

Figura 88. CVs obtidos no $\mu\text{TED-4}$ com eletrodos de Au contendo apenas o eletrólito de suporte (linha preta) e uma mistura de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de AA e $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de DA (linha vermelha). Eletrólito de suporte: tampão acetato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ pH 3,8; velocidade de varredura: 50 mV s^{-1} .



FONTE: O autor (2018).

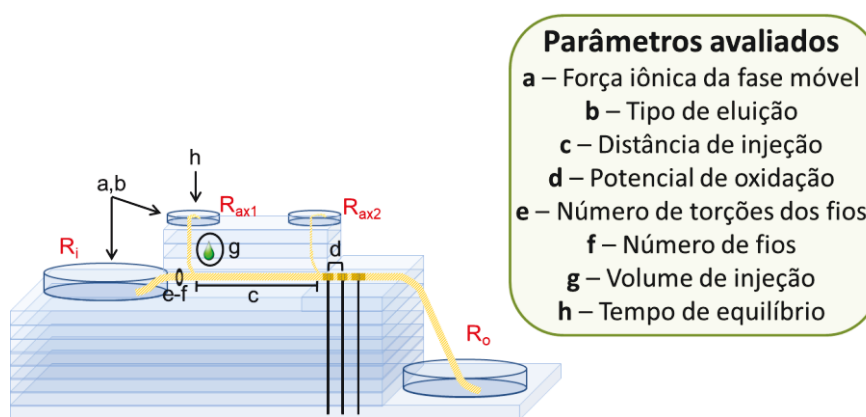
Comparativamente, foi obtido também um CV da mistura dos analitos empregando um eletrodo de referência de Ag/AgCl , sendo observado um deslocamento anódico de $0,05 \text{ V}$ dos processos redox do AA e DA com relação ao eletrodo de pseudo referência de Au empregado nas análises do $\mu\text{TED-4}$.

4.4.3 Avaliação e otimização das condições experimentais

Para a realização das separações cromatográficas e detecção eletroquímica do AA e DA, foi empregado como eletrólito de suporte e fase móvel soluções de tampão acetato pH 3,8 com diferentes forças iônicas. A mistura dos analitos (AA e DA) foi injetada com o auxílio de uma micropipleta diretamente em C_m , com a separação ocorrendo no próprio canal microfluídico durante o transporte da amostra da região de injeção até a célula de detecção. Tal separação tem por base o mecanismo de troca iônica dos analitos (os quais possuem diferentes valores de pKa) com os grupos carboxílicos presentes na superfície dos fios de algodão tratados.⁴⁶⁸ Devido as diferenças na interação dos analitos com os fios de algodão, as espécies chegavam na zona de detecção em momentos distintos, permitindo assim a determinação seletiva do AA e DA por cronoamperometria.

Desta forma, para obter análises rápidas com alta sensibilidade e separações cromatográficas completas, os principais parâmetros relacionados à metodologia de análise e às configurações do μ TED-4 foram estudados e otimizados (Figura 89), utilizando em todos estes estudos soluções contendo $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de AA + $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de DA.

Figura 89. Parâmetros da metodologia e do μ TED-4 avaliados e otimizados (indicadas pelas letras a-h) para a realização de separações cromatográficas e detecção de AA e DA por cronoamperometria.



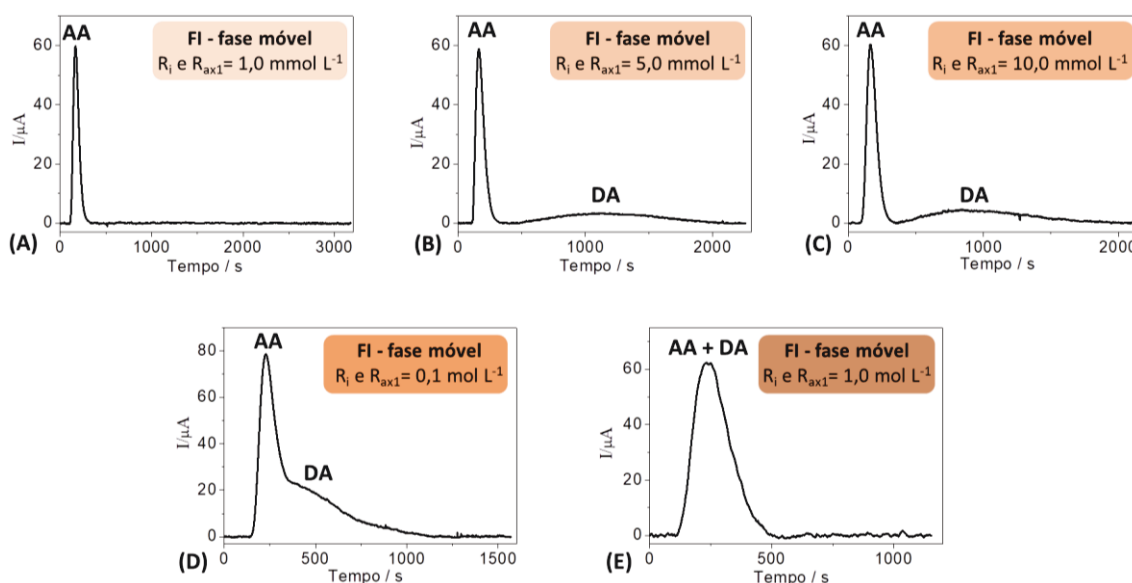
FONTE : O autor (2018).

Em separações baseadas no mecanismo de troca iônica, as características da fase móvel (principalmente a força iônica - FI) desempenham um papel fundamental no processo, devido à competição dos íons da amostra e da fase móvel pelos grupos funcionais presentes na fase estacionária.⁴⁶⁹ Assim, o primeiro parâmetro avaliado foi a FI do tampão acetato empregado nas medidas com o μ TED-4, sendo realizadas eluições isocráticas da mistura de AA e DA com detecção por cronoamperometria, empregando

tampão acetato com forças iônicas entre $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ e $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ como fase móvel em R_i e R_{ax1} . Em R_{ax2} foi mantida uma solução de tampão acetato $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ durante todas as análises, visto que o canal microfluídico C_{ax2} , o qual estava conectado a R_{ax2} , tinha a função de evitar grandes alterações de FI da solução presente na zona de detecção, independente da característica da fase móvel empregada na região de separação.

Assim, de acordo com os resultados obtidos nas eluições isocráticas, em todas as FI avaliadas, o AA apresentou uma eluição rápida, sendo a primeira espécie a ser detectada (Figura 90), indicando assim a ausência ou uma fraca interação com os fios de algodão, comportamento que é explicado pelo seu valor de pK_a (4,17),⁴⁷⁰ sendo que em pH 3,8, o AA apresentava-se majoritariamente como uma molécula neutra. Já para a DA, que possui um pK_a de 8,93,⁴⁷¹ e por isso encontrava-se totalmente protonada em pH 3,8, foi observada uma retenção total nos fios de algodão empregando fase móvel com FI de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ (Figura 90A) além de separações incompletas com o AA em FI altas (0,10 e $1,0 \text{ mol L}^{-1}$) (Figuras 90D-E) e separações completas dos analitos apenas nos ensaios realizados em fases móveis com FI de 5,0 e $10,0 \text{ mmol L}^{-1}$ (Figuras 90B-C). Este comportamento é explicado pela forte interação da DA (positiva) com os grupos carboxílicos (negativos) presentes nos fios de algodão quando são empregadas fases móveis com baixa FI, devido à pequena competição do analito com os íons da fase móvel pela fase estacionária. A medida que a FI da fase móvel foi aumentada, a interação da DA com os fios de algodão sofreu maior interferência dos íons da fase móvel, impossibilitando assim uma separação completa com o AA.

Figura 90. Eluições isocráticas de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de AA + $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de DA empregando o μ TED-4 com fases móveis compostas por tampão acetato pH 3,8 com forças iônicas entre $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ e $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ em R_i e C_{ax1} e $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ em C_{ax2} em todas as análises. Potencial aplicado: 0,60 V; volume de injeção: $1,0 \mu\text{L}$.

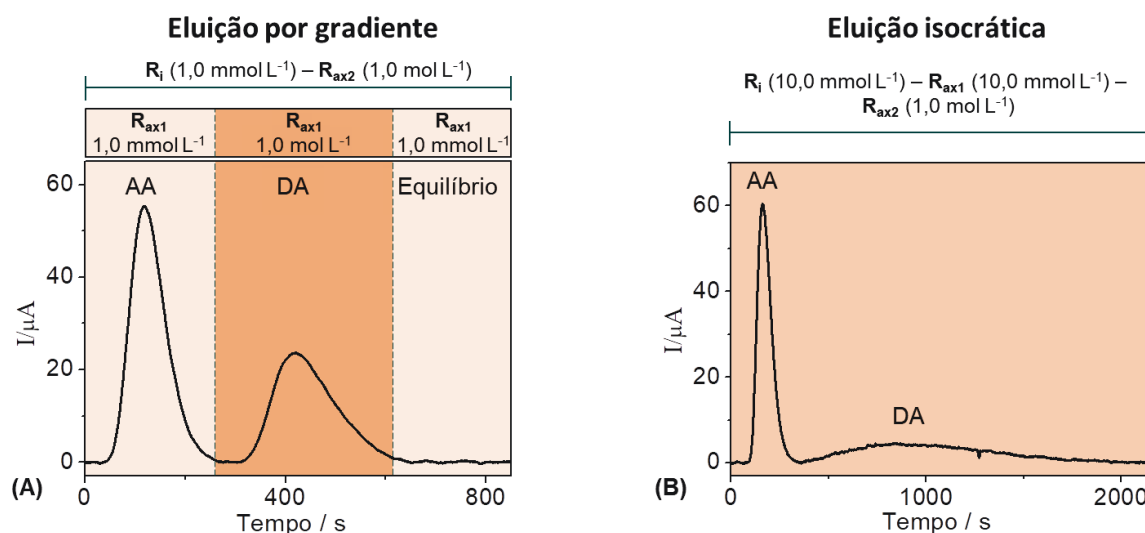


FONTE: O autor (2018).

Embora a eluição isocrática possibilitou a realização de separações cromatográficas efetivas no μ TED-4, foi avaliada também a eluição por gradiente, de modo a reduzir o tempo total de análise. Assim, com base nos valores de FI empregados nos ensaios realizados na eluição isocrática e na eficiência da retenção e separação das espécies, foi realizada uma análise de AA e DA com eluição por gradiente dividida em três etapas, com o gradiente sendo obtido através de alterações na FI da fase móvel (tampão acetato) contida em R_{ax1} .

Inicialmente, para a eluição apenas do AA, foi adicionada uma fase móvel com FI de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em R_{ax1} . Após a obtenção do sinal transiente correspondente ao AA (Figura 91A), a fase móvel de R_{ax1} foi alterada para uma FI de $1,0 \text{ mol L}^{-1}$, tendo por objetivo a eluição da DA retida na região de separação do canal microfluídico. Por fim, após a obtenção da resposta eletroquímica para a DA, a fase móvel presente em R_{ax1} foi novamente alterada para uma FI de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$, de modo a preparar o dispositivo para uma nova injeção da amostra (tempo de equilíbrio). Durante toda a análise, foram mantidas fases móveis com FI de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em R_i e $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ em R_{ax2} (para evitar oscilações na linha base da medida cronoamperométrica).

Figura 91. Respostas cronoamperométricas obtidas no μ TED-4 para $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de AA + $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de DA com fases móveis compostas por tampão acetato pH 3,8 com diferentes FI empregando (A) eluição por gradiente e (B) eluição isocrática. Potencial aplicado: $0,60 \text{ V}$; volume de injeção: $1,0 \text{ }\mu\text{L}$.



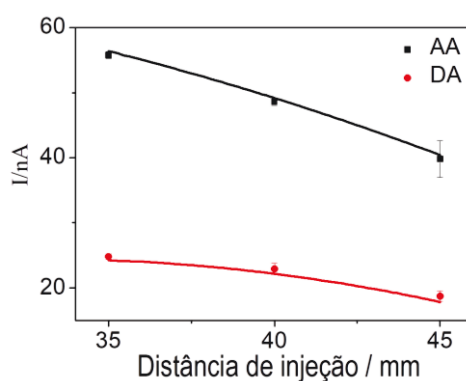
FONTE: O autor (2018).

Assim, o tempo total necessário para a determinação de AA e DA empregando a eluição por gradiente foi de 840 s (14 minutos) (incluindo o tempo de equilíbrio), representando uma redução significativa quando comparada com a análise realizada por eluição isocrática com fase móvel possuindo uma FI de $10,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em R_i e R_{ax1} (Figura 91B), a qual apresentou um tempo total de análise de 2040 s (34 minutos). Para

confirmar que os sinais transientes observados na Figura 91 para ambos os tipos de eluição (por gradiente e isocrática) correspondiam aos analitos separados, medidas individuais foram realizadas com o AA e DA, sendo comparados os tempos de eluição de cada espécie e suas intensidades de sinal com relação as análises da mistura dos analitos. Em ambas as medidas (individuais e para a mistura dos analitos) foram observados tempos de eluição e sinais transientes com valores de corrente similares, indicando assim a separação completa do AA e DA no μ TED-4. Desta forma, devido ao menor tempo de análise, para o restante do trabalho, foram realizadas medidas com separações em eluição por gradiente.

Para a realização de separações cromatográficas eficientes, a região do dispositivo que funciona como coluna cromatográfica deve possuir um comprimento mínimo de modo a apresentar área suficiente para a interação com as espécies e permitir separações completas. No μ TED-4, a região localizada entre o ponto de injeção da amostra e a zona de detecção funcionava como coluna cromatográfica, com seu comprimento que podendo ser alterado com a variação do local onde a amostra foi injetada no canal microfluídico. Assim, para avaliar o comprimento necessário da região de separação no dispositivo proposto, análises foram feitas da mistura de AA e DA, com distâncias de injeção (em relação a zona de detecção) entre 10 e 45 mm. Separações completas foram observadas apenas para distâncias superiores a 35 mm (Figura 92), além de uma diminuição progressiva nas intensidades de corrente das espécies para distâncias de 40 e 45 mm, o que se deve a maior dispersão dos analitos no caminho até a região de detecção.⁴²⁶ Desta forma, uma distância de injeção (e conseqüentemente, o comprimento da região de separação) de 35 mm foi selecionada para o decorrer do trabalho.

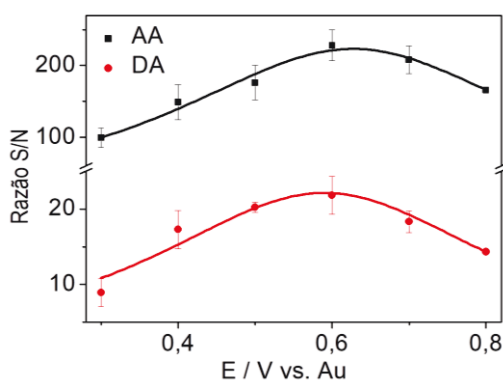
Figura 92. Efeito da distância de injeção nas respostas obtidas com o μ TED-4 para $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de AA + $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de DA. Potencial aplicado: 0,60 V; eletrólito de suporte: tampão acetato pH 3,8; volume de injeção: $1,0 \text{ }\mu\text{L}$.



FONTE: O autor (2018).

Na sequência, foram estudados quatro parâmetros que afetavam principalmente a sensibilidade na detecção do AA e DA. Primeiro, foi avaliado o potencial de oxidação utilizado nas análises cronoamperométricas, sendo empregada novamente a razão S/N para compensar possíveis oscilações da linha base. Para a realização deste estudo, foram utilizados valores de potenciais entre 0,30 e 0,80 V vs. Au, sendo observado um aumento progressivo nos valores de S/N para ambas as espécies com potenciais maiores (Figura 93), com a melhor razão sendo obtida em 0,60 V, indicando uma oxidação completa das espécies neste potencial (concordando com a análise de CV, onde foram obtidos picos de oxidação em 0,50 e 0,52 V para AA e DA, respectivamente) e uma diminuição de S/N em 0,70 e 0,80 V, devido aos altos valores de corrente da linha base. Assim, para os próximos estudos, foi utilizado um potencial de oxidação de 0,60 V.

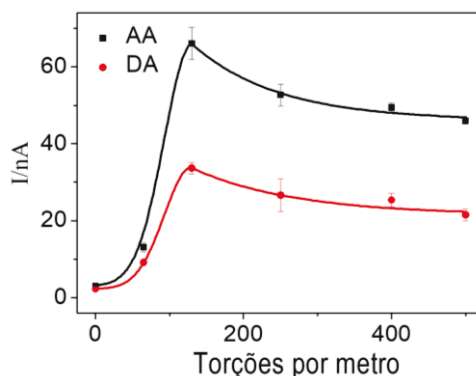
Figura 93. Influência do potencial de oxidação para a detecção cronoamperométrica de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de AA + $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de DA. Eletrólito de suporte: tampão acetato pH 3,8; volume de injeção: $1,0 \text{ }\mu\text{L}$.



FONTE: O autor (2018).

Em seguida, foi avaliado o número de torções dos fios de algodão que compõe o C_m do dispositivo. Assim, separações cromatográficas de AA e DA com posterior detecção eletroquímica foram realizadas com os fios de C_m possuindo entre 0 e 500 torções por metro. O máximo de corrente para os analitos foi observado no canal contendo 130 torções por metro (Figura 94), o qual apresentou o melhor compromisso entre dois fenômenos: o aumento da diluição da amostra com um menor número de torções (0 e 65 torções por metro) e a diminuição na vazão para valores elevados de torções (250 - 500 torções por metro), fenômenos que ocorrem devido a alteração dos espaços entre as fibras e entre os fios como resultado da variação do número de torções.¹²⁷ Desta forma, foi selecionado o valor de 130 torções por metro para ser utilizado em C_m para as próximas análises com o $\mu\text{TED-4}$.

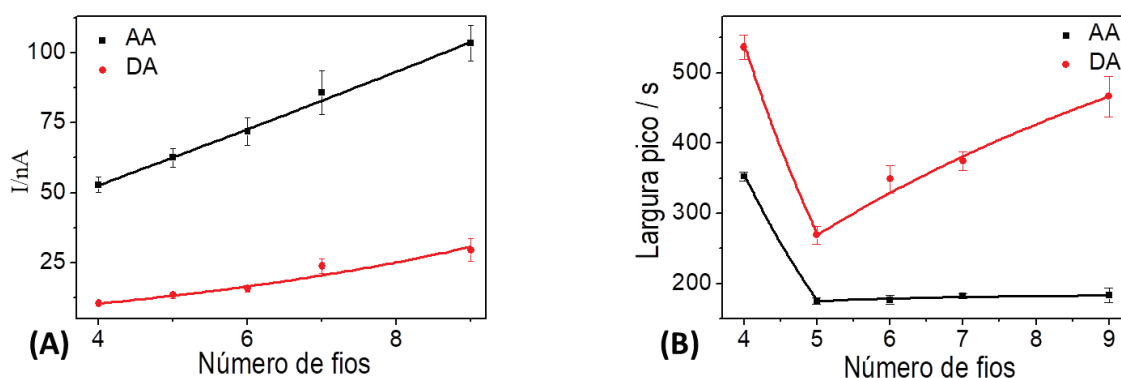
Figura 94. Relação entre o número de torções por metro dos fios de C_m e as correntes obtidas para a determinação de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de AA + $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de DA por cronoamperometria. Potencial aplicado: $0,60 \text{ V}$; eletrólito de suporte: tampão acetato pH 3,8; volume de injeção: $1,0 \mu\text{L}$.



FONTE: O autor (2018).

A influência do número de fios que compõe o C_m também foi estudada para as análises de AA e DA, através da construção e avaliação de dispositivos com C_m contendo entre 4 e 9 fios. De acordo com os resultados obtidos, foi observado um aumento progressivo nos valores de corrente com canais contendo quantidades maiores de fios (Figura 95A), comportamento que é explicado pela elevação nas vazões e nas áreas dos eletrodos de Au.¹⁵⁷ No entanto, foi observada uma variação no tempo de eluição (monitorada pela largura dos sinais transientes) dos analitos (especialmente da DA) com a alteração no número de fios do canal, sendo que a eluição mais rápida foi obtida com o canal construído com 5 fios, como mostrado na Figura 95B.

Figura 95. Efeito do número de fios que compõe C_m nas (A) intensidades de corrente obtidas para $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de AA + $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de DA por cronoamperometria e (B) na largura dos sinais transientes correspondente a cada analito. Potencial aplicado: $0,60 \text{ V}$; eletrólito de suporte: tampão acetato pH 3,8; volume de injeção: $1,0 \mu\text{L}$.



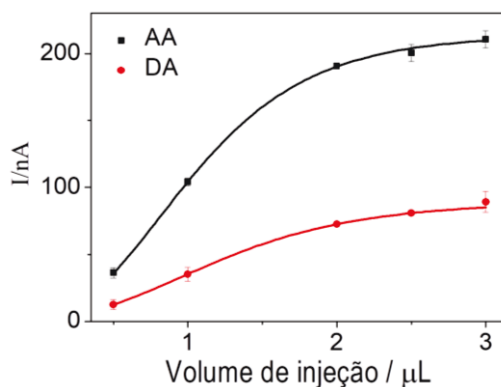
FONTE: O autor (2018).

Os sinais transientes mais largos (e consequentemente com tempo maior de análise) para o C_m contendo 4 fios se devem a menor vazão apresentada por este canal.

Além disso, os canais contendo 6 a 9 fios também mostraram tempos elevados para a eluição da DA, devido a uma maior dificuldade na eluição deste analito, visto que o aumento do número de fios ocasionou volumes maiores de solução que passavam por C_m , gerando uma grande diluição e, conseqüente, uma diminuição da FI da fase móvel (tampão acetato $1,0 \text{ mol L}^{-1}$) proveniente de C_{ax1} , a qual é responsável pela eluição da DA na região de separação. Assim, para o decorrer do trabalho, os C_m empregados nas análises com o $\mu\text{TED-4}$ foram construídos com 5 fios.

O volume de injeção da amostra foi outro parâmetro avaliado e otimizado. Para isso, separações cromatográficas e detecção eletroquímica de AA e DA foram realizadas no $\mu\text{TED-4}$ para volumes de injeção dos analitos entre 0,5 e 3,0 μL . Foram observados aumentos significativos nos sinais cronoamperométricos de ambas as espécies entre 0,5 e 2,0 μL e incrementos discretos para injeções de 2,5 e 3,0 μL (Figura 96), além de picos mais largos para estes volumes, indicando um maior espalhamento das amostras ao longo de C_m devido ao grande volume injetado, necessitando assim de tempos maiores para o deslocamento de todo o analito até a região de detecção e para a limpeza do canal. Assim, para a sequência dos estudos foi utilizado um volume de injeção de amostra de 2,0 μL .

Figura 96. Valores de correntes obtidas para $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de AA + $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de DA com a variação do volume de injeção dos analitos. Potencial aplicado: 0,60 V; eletrólito de suporte: tampão acetato pH 3,8.

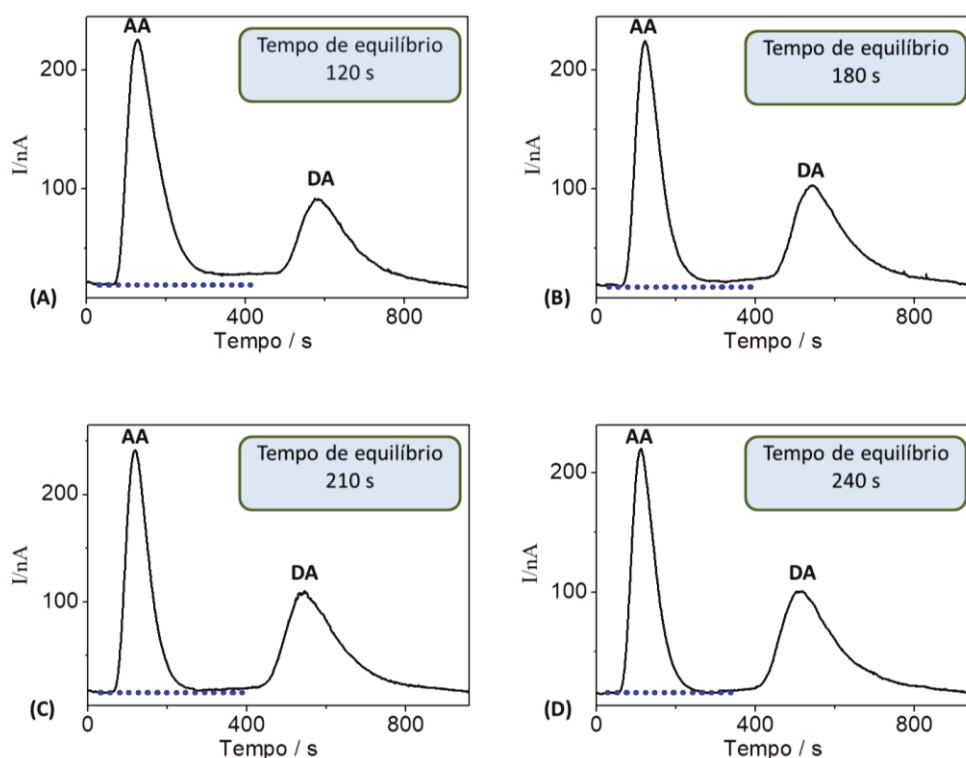


FONTE: O autor (2018).

Por fim, para avaliar a influência do tempo de equilíbrio (entre uma medida e outra) na eficiência das separações realizadas no $\mu\text{TED-4}$, análises foram feitas com intervalos de 120 a 240 s entre o fim da eluição do DA e a próxima injeção, sendo iniciada a contagem do tempo de equilíbrio a partir da troca do tampão acetato com FI de $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ pela solução com FI de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em R_{ax1} . Através dos sinais transientes obtidos para o AA e DA, foi observado que apenas para o tempo de equilíbrio de 240 s ocorreu a separação completa das espécies (Figura 97), sendo estabelecido como

critério de separação o retorno da linha base ao seu valor original entre o transiente do AA e da DA. Assim, nas próximas separações realizadas com o μ TED-4, foi escolhido um tempo de equilíbrio de 240 s, valor mínimo necessário para que a fase móvel da região de separação do canal microfluídico retorne para uma condição de baixa FI e permita uma interação efetiva da DA com a fase estacionária (fios de algodão).

Figura 97. Influência do tempo de equilíbrio na eficiência das separações cromatográficas de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de AA + $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de DA realizadas no μ TED-4. Potencial aplicado: $0,60 \text{ V}$; eletrólito de suporte: tampão acetato pH 3,8; volume de injeção: $2,0 \mu\text{L}$.



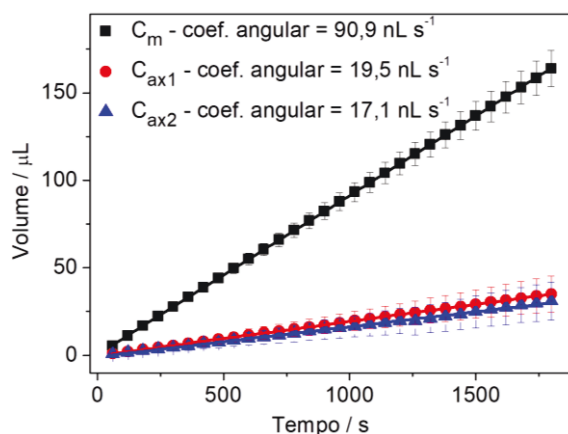
FONTE: O autor (2018).

4.4.4 Caracterização do μ TED-4

Após o estabelecimento da melhor configuração do dispositivo, avaliações relacionadas a vazão dos canais microfluídicos foram realizadas no μ TED-4. Para isso, medidas ($n = 3$) do volume de solução presente em R_0 em função do tempo (30 minutos de avaliação) foram realizadas com o auxílio de uma balança analítica, de modo a obter a vazão individual de cada canal microfluídico e o valor total no μ TED-4. Para os três canais microfluídicos avaliados (C_m , C_{ax1} e C_{ax2}), foram observadas relações volume x tempo lineares, com a obtenção de $R^2 = 0,9999$ em todos os estudos, indicando fluxos livres de oscilações e vazões (obtidas a partir do coeficiente angular) de $90,9 \text{ nL s}^{-1}$, $19,5 \text{ nL s}^{-1}$ e $17,1 \text{ nL s}^{-1}$ para C_m , C_{ax1} e C_{ax2} , respectivamente (Figura 98). Além disso, o

dispositivo completo (contendo os três canais microfluídicos) alcançou uma vazão de $127,5 \text{ nL s}^{-1}$, valor adequado para a realização de separações cromatográficas por troca iônica, visto que vazões moderadas são interessantes para permitir uma interação efetiva entre o analito e a fase estacionária.^{469,472}

Figura 98. Relação entre o volume de solução transportado em C_m , C_{ax1} e C_{ax2} e o tempo, com a indicação dos coeficientes angulares obtidos nos canais microfluídicos do $\mu\text{TED-4}$ durante 30 minutos de avaliação.



FONTE: O autor (2018).

Com base nas vazões obtidas para C_m e C_{ax1} , foi possível estimar a FI da fase móvel que passava pela região de separação do dispositivo durante a eluição da DA, a qual era composta pela mistura do tampão acetato $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ proveniente de R_i e do tampão acetato $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ presente em R_{ax1} . Desta forma, foi calculada uma FI de aproximadamente $0,20 \text{ mol L}^{-1}$ para a fase móvel presente na região de separação, valor significativamente maior quando comparado com a FI da fase móvel empregada na etapa de eluição do AA, a qual era composta por tampão acetato $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$.

Por fim, com base nos valores de vazão e nas medidas realizadas no $\mu\text{TED-4}$ com eluição por gradiente, o dispositivo apresentou um tempo total de análise de 14 minutos para a separação e detecção de AA e DA, valor interessante quando comparado com os tempos de análise apresentados pelos sistemas de separação baseados em papel (25 a 30 min)^{392,394} ou pelos métodos tradicionais de cromatografia líquida (0,5 a 105 min).⁴⁶⁸ Além disso, as medidas realizadas no $\mu\text{TED-4}$ apresentaram um custo inferior a 0,01 centavos de real para cada análise e um volume de resíduo gerado de apenas $107,1 \text{ µL}$, valores extremamente baixos, mesmo quando comparados com as alternativas mais ecológicas de sistemas de cromatografia líquida, os quais apresentam, para cada análise, custos de 0,16 a 12,47 reais e uma quantidade de resíduos gerado entre 1,6 a $30,0 \text{ mL}$.⁴⁷³

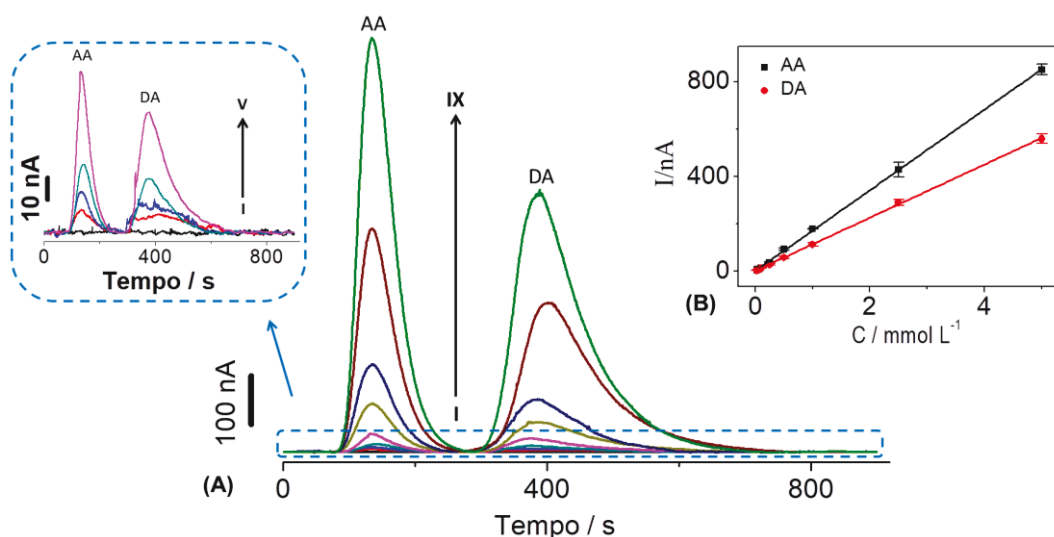
4.4.5 Desempenho analítico do μ TED-4 para a separação e determinação de ácido ascórbico e dopamina

Para a avaliação do desempenho analítico do μ TED-4, inicialmente, foi realizada a construção de uma curva de calibração através das análises (em triplicata) de soluções contendo misturas de AA e DA com concentrações entre 0,025 e 5,0 mmol L⁻¹ para ambas as espécies. Separações efetivas foram obtidas para os analitos ao longo de toda a faixa estudada, com os sinais transientes (de uma das injeções da triplicata de cada concentração) sendo mostrados na Figura 99A. De acordo com as intensidades de corrente obtidas para o AA e DA, foram construídas curvas de calibração que mostraram respostas lineares para ambas as espécies na faixa de concentração avaliada (entre 0,025 a 5,0 mmol L⁻¹) (Figura 99B), com a obtenção das seguintes equações de regressão linear:

$$\text{AA: } i(\text{nA}) = 1,65 (\text{nA}) + 170,0 C_{\text{AA}} (\text{mmol L}^{-1}) \quad (R^2 = 0,9997) \quad (17)$$

$$\text{DA: } i(\text{nA}) = 1,93 (\text{nA}) + 110,0 C_{\text{DA}} (\text{mmol L}^{-1}) \quad (R^2 = 0,9988) \quad (18)$$

Figura 99. Respostas cronoamperométricas obtidas com o μ TED-4 para soluções contendo misturas de AA e DA em tampão acetato pH 3,8, com as seguintes concentrações de ambas as espécies: (I) 0,00, (II) 0,025, (III) 0,05, (IV) 0,10, (V) 0,25, (VI) 0,50, (VII) 1,00, (VIII) 2,50 e (IX) 5,00 mmol L⁻¹. No detalhe, são mostrados os sinais referentes as menores concentrações (I-V) dos analitos. (B) Curvas de calibração construídas a partir das respostas obtidas em A. Potencial aplicado: 0,60 V; eletrólito de suporte: tampão acetato pH 3,8; volume de injeção: 2,0 μ L.



FONTE: O autor (2018).

Os LDs e LQs das medidas realizadas no μ TED-4 foram calculados de acordo as equações 7 e 8 mostradas na página 103 e com os dados da curva de calibração dos

analitos, sendo obtidos valores de LD de 2,9 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (AA) e 4,4 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (DA) e de LQ de 9,6 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (AA) e 14,7 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (DA). Considerando que até o momento não há relatos na literatura de outros dispositivos microfluídicos utilizados em separações cromatográficas e posterior determinação eletroquímica de AA e DA, o desempenho analítico do $\mu\text{TED-4}$ foi comparado com trabalhos que realizaram análises simultâneas de AA e DA em sistemas eletroquímicos convencionais com separação voltamétrica das espécies. Desta forma, o $\mu\text{TED-4}$ apresentou uma faixa linear maior e valores de LDs semelhantes ou ligeiramente superior aos outros trabalhos da literatura (Tabela 12). Além disso, a faixa linear e os LDs obtidos pelo $\mu\text{TED-4}$ permitem a sua aplicação na determinação simultânea de AA e DA em lágrima, visto que as concentrações relatadas neste fluido corporal variam de 0,1 a 1,3 mmol L^{-1} para o AA e de 0,4 mmol L^{-1} a 1,0 mmol L^{-1} para a DA.^{474,475}

Tabela 12. Comparação da faixa linear e LDs obtidos para separação e detecção do AA e DA com o $\mu\text{TED-4}$ e com outros trabalhos apresentados na literatura.

Eletrodo	Faixa linear ($\mu\text{mol L}^{-1}$)		LD ($\mu\text{mol L}^{-1}$)		Ref.
	AA	DA	AA	DA	
AuNPs@MoS ₂ -NSs/GCE	20,0 – 300,0	5,0 – 200,0	3,0	1,0	383
PAH-HCNTs/GCE	7,5 – 180,0	2,5 – 105,0	0,9	0,8	476
PAA/PPy/GO/GCE	300,0 – 440,0	32,0 – 60,0	2,0	1,0	386
PdNPs/GR/CS/GCE	100,0 – 4000,0	0,5 – 200,0	20,0	0,1	385
CTAB-GO/MWNT/GCE	5,0 – 300,0	5,0 – 500,0	1,0	1,5	477
p-AHMP/GCE	20,0 – 350,0	5,0 – 115,0	1,2	0,3	478
Trp-GR/GCE	200,0 – 12900,0	0,5 – 110,0	10,0	0,3	479
Eletrodos de Au	25,0 – 5000,0	25,0 – 5000,0	2,9	4,4	Este trabalho

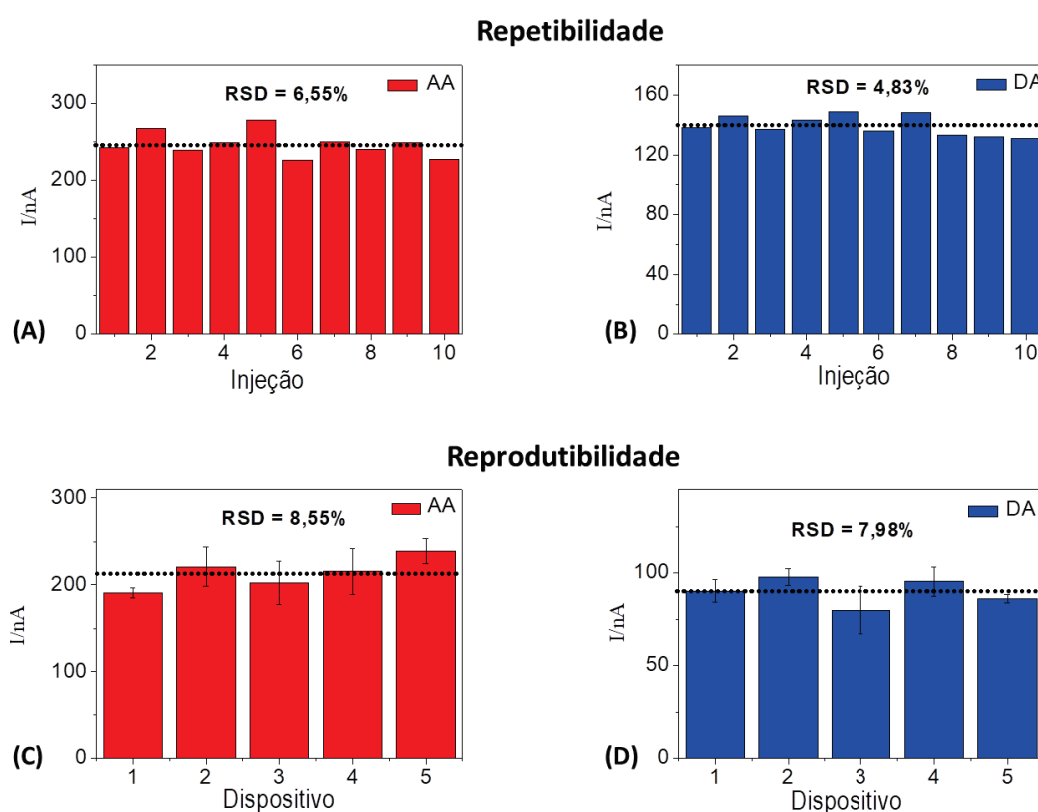
Abreviaturas: AuNPs@MoS₂-NSs/GCE – eletrodo de carbono vítreo modificado com nanopartículas de Au e nanofolhas de MoS₂. PAH-HCNTs/GCE – eletrodo de carbono vítreo modificado com nanotubos de carbono helicoidal e poli(cloridrato de alilamina). PAA/PPy/GO/GCE – eletrodo de carbono vítreo modificado com nanofolhas de óxido de grafeno, polipirrol e ácido poliacrílico. PdNPs/GR/CS GCE – eletrodo de carbono vítreo modificado com quitosana, grafeno e nanopartículas de paládio. CTAB-GO/MWNT/GCE – eletrodo de carbono vítreo modificado com nanotubos de carbono, óxido de grafeno e brometo de hexadecil trimetil amônio. p-AHMP/GCE – eletrodo de carbono vítreo modificado com 4-amino-6-hidroxi-2-mercaptopirimidina. Trp-GR/GCE – eletrodo de carbono vítreo modificado com nanocompósito de grafeno e triptofano.

FONTE: O autor (2018). Valores obtidos das referências 383, 385, 386, 476-479.

O desempenho do $\mu\text{TED-4}$ também foi avaliado com relação a estabilidade nas separações cromatográficas e nas detecções eletroquímicas realizadas neste dispositivo. Para isso, estudos de repetibilidade e reprodutibilidade foram feitos para injeções de uma solução de tampão acetato pH 3,8 contendo 1,0 mmol L^{-1} de AA e 1,0 mmol L^{-1} de DA. De acordo com os valores de corrente obtidos para 10 injeções consecutivas dos analitos (repetibilidade), foram obtidos RSDs de 6,55% para o AA e 4,83% para a DA (Figuras

100A-B). Já na avaliação das análises realizadas com 5 dispositivos diferentes (reprodutibilidade), foram calculados RSDs de 8,55% para o AA e 7,98% para a DA (Figuras 100C-D). Assim, os resultados observados indicaram uma alta estabilidade do μ TED-4 durante a separação e detecção de AA e DA, além da eluição completa dos analitos, ausência de lixiviação ou oxidação dos eletrodos de ouro e um bom controle de todas as etapas de fabricação dos dispositivos.

Figura 100. Valores de corrente e RSDs obtidos com o μ TED-4 nas análises de uma mistura de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de AA e $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de DA para (A-B) 10 injeções consecutivas e para (C-D) 5 dispositivos diferentes. A linha pontilhada horizontal indica o valor médio das correntes obtidas. Potencial aplicado: $0,60 \text{ V}$; eletrólito de suporte: tampão acetato pH 3,8; volume de injeção: $2,0 \mu\text{L}$.

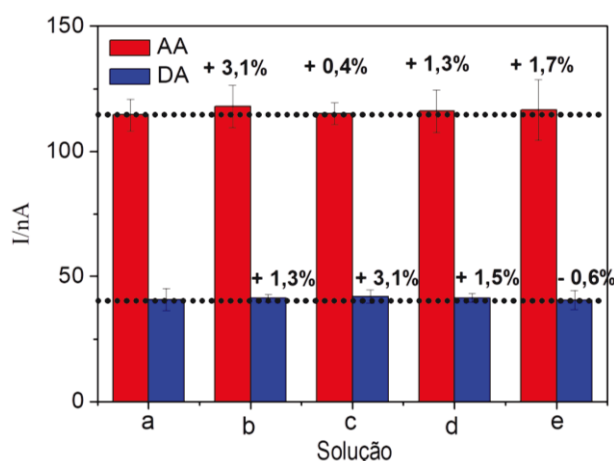


FONTE: O autor (2018).

Por fim, a seletividade do μ TED-4 foi avaliada através da influência na separação e na resposta eletroquímica do AA e DA para análises realizadas em soluções contendo além dos analitos (com concentrações de $0,50 \text{ mmol L}^{-1}$ de AA e $0,50 \text{ mmol L}^{-1}$ de DA), $0,50 \text{ mmol L}^{-1}$ de glicose, $10,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de lactato e/ou $10,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de ureia, as quais são as principais espécies potencialmente interferentes e suas respectivas concentrações normalmente encontradas na lágrima.^{335,459} As avaliações foram realizadas tanto em soluções contendo os analitos e apenas uma espécie potencialmente interferente de cada vez (avaliação individual), quanto em uma solução contendo todas as espécies (AA,

DA, glicose, lactato e ureia) para a avaliação conjunta da influência dos compostos na detecção dos analitos. Em todas as soluções avaliadas, não foram observadas interferências na separação de AA e DA, além de serem obtidas variações de corrente de no máximo $\pm 3,1\%$ na determinação cronoamperométrica dos analitos (Figura 101), mostrando assim a potencialidade do μ TED-4 para a separação e determinação seletiva de AA e DA em lágrimas.

Figura 101. Variações nas respostas obtidas com o μ TED-4 para a detecção de AA e DA em soluções contendo espécies potencialmente interferentes, com as seguintes concentrações: (a) $0,50 \text{ mmol L}^{-1}$ de AA + $0,50 \text{ mmol L}^{-1}$ de DA; (b) $0,50 \text{ mmol L}^{-1}$ de AA + $0,50 \text{ mmol L}^{-1}$ de DA + $0,50 \text{ mmol L}^{-1}$ de glicose; (c) $0,50 \text{ mmol L}^{-1}$ de AA + $0,50 \text{ mmol L}^{-1}$ de DA + $10,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de lactato; (d) $0,50 \text{ mmol L}^{-1}$ de AA + $0,50 \text{ mmol L}^{-1}$ de DA + $10,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de ureia; (e) $0,50 \text{ mmol L}^{-1}$ de AA + $0,50 \text{ mmol L}^{-1}$ de DA + $0,50 \text{ mmol L}^{-1}$ de glicose + $10,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de lactato + $10,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de ureia. Potencial aplicado: $0,60 \text{ V}$; eletrólito de suporte: tampão acetato pH 3,8; volume de injeção: $2,0 \mu\text{L}$.



FONTE: O autor (2018).

4.4.6 Determinação de ácido ascórbico e dopamina em amostras de lágrimas

Para demonstrar o desempenho e viabilidade na aplicação do μ TED-4 em amostras reais, determinações dos níveis de AA e DA presentes nas lágrimas de três voluntários saudáveis foram realizadas com o dispositivo. A quantificação foi feita através do método de adição de padrão, com as lágrimas sendo analisadas (injeções de $2,0 \mu\text{L}$) da forma como foram coletadas, sem sofrer nenhum processo de purificação. De acordo com os resultados obtidos, foram observadas concentrações de AA entre 39 e $66 \mu\text{mol L}^{-1}$ e de DA entre 101 e $122 \mu\text{mol L}^{-1}$ nas amostras de lágrimas (Tabela 13), valores que estão dentro da faixa de concentração dos analitos encontrados neste fluido e relatados na literatura.^{474,475} Além disso, os resultados das análises apresentaram recuperações entre 94 e 105% para o AA e de 92 a 109% para a DA, com RSDs $\leq \pm 6\%$ ($n = 3$) para todas as medidas. Assim, as análises de AA e DA em lágrimas mostraram uma boa

precisão e a capacidade do μ TED-4 em realizar separações cromatográficas com detecção eletroquímica seletiva de AA e DA em amostras reais.

Tabela 13. Resultados das análises realizadas com o μ TED-4 para a determinação de AA e DA em amostras de lágrimas.

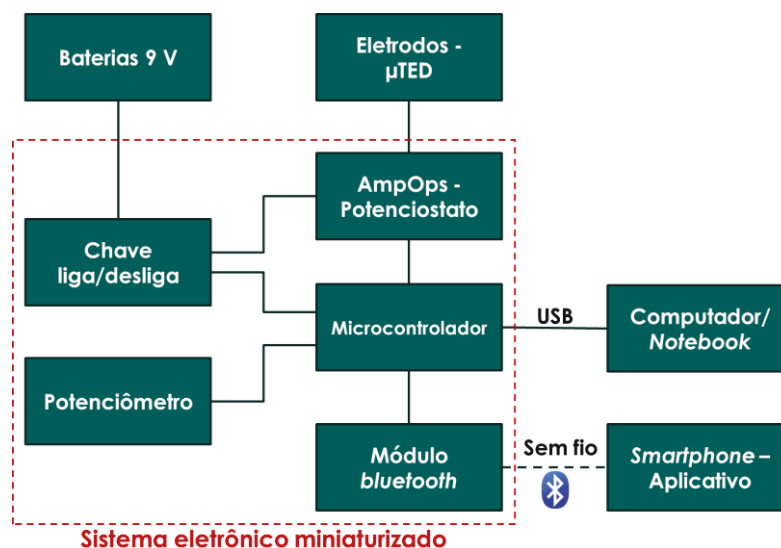
Amostra (lágrima)	Adicionado ($\mu\text{mol L}^{-1}$)		Encontrado ($\mu\text{mol L}^{-1}$)		Recuperação (%)	
	AA	DA	AA	DA	AA	DA
1	0,0	0,0	66 ± 2	101 ± 5	-	-
	75,0	100,0	140 ± 2	193 ± 2	99 ± 3	92 ± 4
	100,0	200,0	171 ± 1	309 ± 3	105 ± 1	104 ± 5
2	0,0	0,0	39 ± 4	122 ± 1	-	-
	50,0	100,0	86 ± 1	218 ± 5	94 ± 2	96 ± 3
	75,0	200,0	113 ± 2	338 ± 6	99 ± 3	109 ± 6
3	0,0	0,0	51 ± 2	119 ± 4	-	-
	75,0	100,0	124 ± 4	213 ± 2	97 ± 6	93 ± 4
	100,0	200,0	149 ± 2	305 ± 3	97 ± 3	93 ± 4

FONTE: O autor (2018).

4.5 PARTE V – μ TED-5

O dispositivo construído na quinta e última parte do projeto tinha o objetivo de realizar análises em microfluxo com detecção eletroquímica em uma plataforma versátil e totalmente portátil, boa autonomia e alta sensibilidade nas análises. Os componentes integrados ao μ TED-5 e que foram utilizados durante a realização das medidas eletroquímicas são descritos esquematicamente na Figura 102. Tais componentes incluíam os eletrodos conectados ao canal microfluídico do dispositivo, duas baterias de 9 V para alimentação elétrica do μ TED-5 e um sistema eletrônico miniaturizado composto por uma chave liga/desliga, um potenciômetro para ajuste do potencial aplicado nas análises eletroquímicas, AmpOps que funcionavam como um potenciostato para a realização de medidas cronoamperométricas e um microcontrolador responsável pelo gerenciamento e transmissão dos dados das análises via USB para computador ou *notebook* e um módulo *bluetooth* para a transmissão dos dados das medidas via conexão *bluetooth* para *smartphones*. Para a recepção das informações das análises nos *smartphones*, foi desenvolvido um aplicativo próprio, o qual permitia também o monitoramento em tempo real das medidas e o arquivamento dos dados no próprio aparelho.

Figura 102. Diagrama em blocos mostrando os principais componentes empregados nas análises eletroquímicas realizadas com o μ TED-5.



FONTE: O autor (2018).

O μ TED-5 foi construído em uma plataforma polimérica fabricada em impressora 3D onde foram integrados todos os componentes do dispositivo, tais como sistema eletrônico miniaturizado, baterias de alimentação elétrica, canais microfluídicos (compostos por fios de algodão) e os eletrodos responsáveis pelas detecções eletroquímicas. Para a avaliação da potencialidade analítica do dispositivo (tal como estabilidade e linearidade nas respostas), ensaios foram realizados com três sistemas de eletrodos diferentes (eletrodos baseados em cilindros de grafite, eletrodo de carbono impresso e eletrodos de Au depositados diretamente no canal microfluídico), sendo empregados como analitos o UA, HCZ, AA e EP.

4.5.1 Características do μ TED-5

Com o dispositivo pronto para o uso, foram realizadas avaliações com relação ao custo de fabricação, autonomia de análise e resposta eletroquímica. Inicialmente, foi obtida a estimativa do valor total do μ TED-5, onde os custos foram agrupados entre os principais componentes do dispositivo (Tabela 14). Nesta estimativa, não foram incluídos os valores correspondentes aos equipamentos empregados na construção dos componentes do dispositivo (fresadora CNC, impressora 3D, metalizadora de Au) e dos aparelhos de aquisição dos dados (*notebook* e/ou *smartphone*). Desta forma, o custo total do μ TED-5 foi avaliado em 159,54 reais, um valor acessível e comparável com os custos relatados por outros sistemas portáteis com detecção eletroquímica (entre 195,60 e 260,80 reais)^{190,480} ou baseados na detecção por fluorescência ou por sistemas colorimétricos (entre 21,19 e 1956,00 reais).⁴⁸¹

Tabela 14. Descrição do custo dos componentes utilizados na construção do μ TED-5.

Componente	Quantidade	Custo (reais)
Sistema eletrônico miniaturizado	1 unidade	104,30
Baterias 9 V	2 unidades	20,00
Cabos e conectores	11 unidades	6,00
Polímero ABS	62 metros	23,08
Fios de algodão	150 mm	0,01
Cilindros de grafite	3 unidades	0,48
Eletrodo impresso	1 unidade	5,00
Eletrodos de Au	3 unidades	0,67
TOTAL		159,54

FONTE: O autor (2018).

Para a estimativa da autonomia de análise do μ TED-5, o qual possuía alimentação elétrica feita exclusivamente por 2 baterias de 9 V, inicialmente foi calculado o consumo de energia dos componentes, os quais estão apresentados na Tabela 15. Considerando que o módulo *bluetooth* apresentou um gasto de energia significativo com relação aos outros componentes, foi estimado o consumo do dispositivo em duas situações, (1) para a transmissão de dados via USB para *notebook* e/ou computador (onde não é utilizado o módulo *bluetooth*), com a obtenção de um valor de 20 mA e (2) para a transmissão de dados sem fio (via módulo *bluetooth*) para *smartphone*, o qual apresentou um consumo de 70 mA. Desta forma, a autonomia de análise estimada para o μ TED-5, considerando alimentação elétrica feita por 2 baterias de 9 V com capacidade de 250 mAh cada, foi de 12,5 horas utilizando a transmissão de dados via USB e de 3,5 horas para o envio de dados sem fio, tempo suficiente para a obtenção de uma curva de calibração e para a análise de diversas amostras.

Tabela 15. Consumo de energia estimada dos principais componentes do μ TED-5.

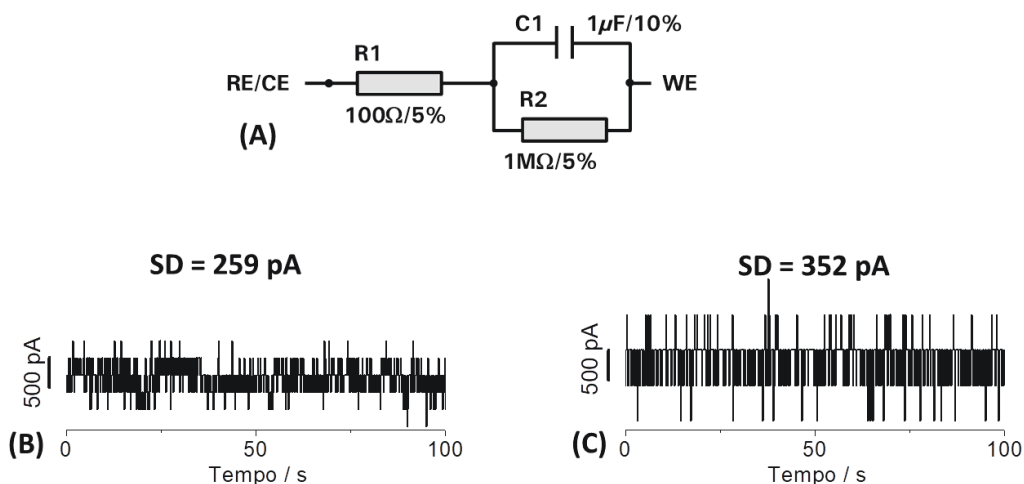
Componente	Consumo (mA)
Sistema de medida (AmpOps, eletrodos, etc)	5
Microcontrolador	15
Módulo bluetooth	50
Medida com transmissão via USB	20
Medida com transmissão sem fio	70

FONTE: O autor (2018).

Por fim, foi realizada uma avaliação inicial da resposta eletroquímica (com relação a corrente lida e ruído) do sistema eletrônico miniaturizado desenvolvido e responsável

pelas análises no μ TED-5, com a comparação dos valores obtidos neste sistema com o potenciostato comercial empregado nas outras partes do projeto (μ Autolab tipo III - Metrohm). Desta forma, análises amperométricas foram realizadas com ambos os equipamentos em um circuito eletrônico teste composto por dois resistores e um capacitor, conforme mostrado na Figura 103A. O potenciostato comercial apresentou um SD entre os valores de corrente lida (ruído) de 259 pA (Figura 103B), além de uma diferença de 0,04% no valor médio de corrente obtida com relação ao valor esperado para o circuito empregado. Já os valores de corrente lida com o sistema eletrônico miniaturizado mostrou um SD de 352 pA (Figura 103C), além de uma diferença de 4,92% no valor médio de corrente obtida com relação ao valor esperado.

Figura 103. (A) Circuito teste empregado nas avaliação dos equipamentos com a indicação dos valores e tolerância dos seus componentes. Linha base e valor de SD para o (B) potenciostato comercial e (C) com o sistema eletrônico miniaturizado.



FONTE: O autor (2018). O circuito teste foi adaptado da referência ⁴⁸².

Assim, a medida realizada com o sistema eletrônico miniaturizado mostrou uma ótima estabilidade e um ruído extremamente baixo (comparável com o equipamento comercial), além de um desvio aceitável no valor da corrente lida, considerando o custo e que era a primeira versão do sistema eletrônico miniaturizado construído. Desta forma, o sistema de medida eletroquímico do μ TED-5 apresentou um desempenho que permite o seu emprego nas análises em microfluxo com fios de algodão, o qual é caracterizado por gerar baixos valores de corrente, normalmente na ordem de nanoamperes. Por fim, para avaliações mais detalhadas da potencialidade analítica e da versatilidade do μ TED-5, análises eletroquímicas foram realizadas com três eletrodos diferentes, cada um sendo empregado para a determinação de um analito distinto.

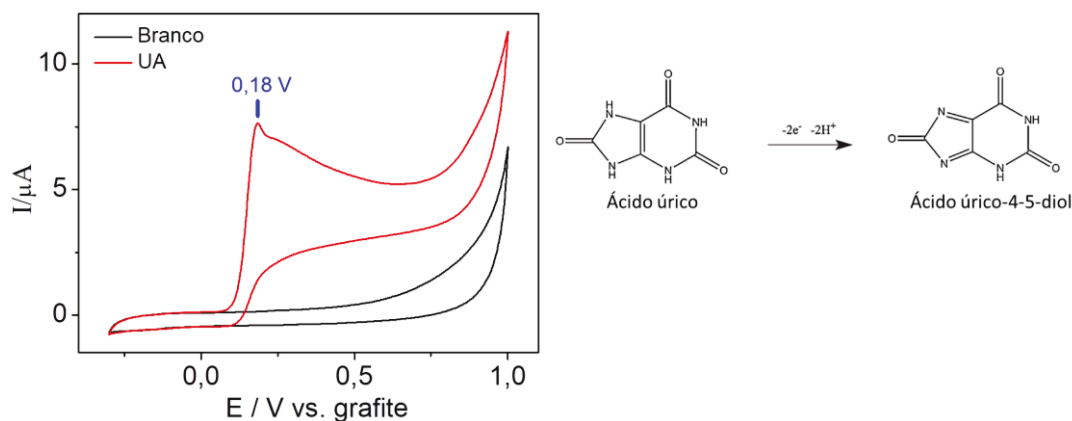
4.5.2 Determinação de ácido úrico com eletrodos de grafite

O μ TED-5 contendo eletrodos de grafite foi montado com características semelhantes ao dispositivo construído na parte II do projeto (μ TED-2), com o RE, WE e CE sendo compostos por cilindros de grafite com diâmetros de 0,5, 0,5 e 0,7 mm, respectivamente, canal microfluídico contendo 9 fios de algodão hidrofílicos, diferença de altura entre os reservatórios de entrada e saída de 52 mm e zona de detecção com dimensões de 6 x 6 mm. Para a caracterização desta configuração do μ TED-5, foi empregado como analito o UA e como eletrólito de suporte PB 0,10 mol L⁻¹ pH 7,4.

4.5.2.1 Comportamento eletroquímico do ácido úrico

Para a avaliação do comportamento eletroquímico do UA nos eletrodos de grafite montados no μ TED-5, foram realizadas análise de CV entre -0,30 e 1,00 V tanto do eletrólito de suporte (prova em branco) quanto do analito (1,0 mmol L⁻¹ de UA em PB 0,10 mol L⁻¹ pH 7,4), empregando o potenciostato comercial, visto que o sistema eletrônico miniaturizado desenvolvido possui apenas a capacidade de realizar medidas cronoamperométricas. Na ausência do analito (prova em branco), o CV não apresentou nenhum processo faradaico, indicando uma boa limpeza do sistema. Já no CV obtido para o UA, foi observado um processo de oxidação em 0,18 V vs. grafite no sentido anódico da varredura de potencial (Figura 104), o qual corresponde a perda de 2e⁻ e 2H⁺ da molécula de UA com a formação irreversível do ácido úrico-4-5-diol,^{483,484} como mostrado nas reações da Figura 104. Consequentemente, no sentido catódico de varredura, nenhum processo de redução foi observado no CV correspondente ao analito.

Figura 104. CVs obtidos com os eletrodos de grafite integrados no μ TED-5 para o eletrólito de suporte (linha preta) e para uma solução contendo 1,0 mmol L⁻¹ de UA. A reação de oxidação do UA também é mostrada. Eletrólito de suporte: PB 0,10 mol L⁻¹ pH 7,4; velocidade de varredura: 50 mV s⁻¹.

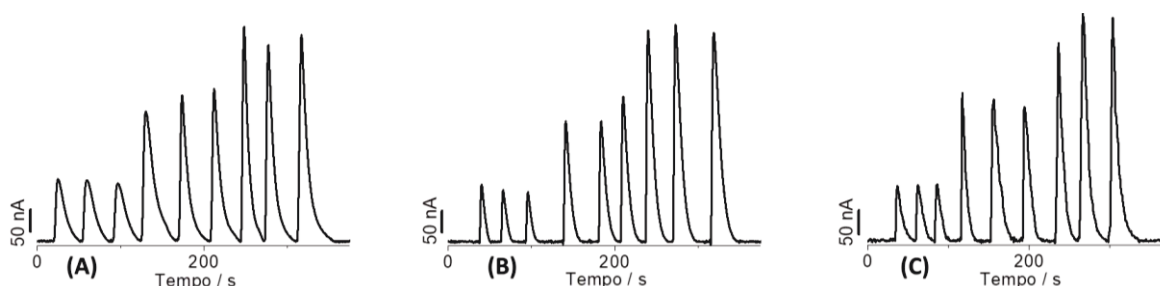


FONTE: O autor (2018). Reações adaptadas da referência 483.

4.5.2.2 Comparação das respostas cronoamperométricas nos eletrodos de grafite

As respostas eletroquímicas obtidas para o UA com o sistema eletrônico miniaturizado através dos eletrodos de grafite integrados no μ TED-5 foram comparadas com as respostas obtidas pelo potenciostato comercial conectado nos mesmos eletrodos que compõe a zona de detecção do μ TED-5. Foram avaliadas as intensidade de corrente obtidas para diferentes concentrações do analito e o desvio padrão da linha base para as análises feitas com ambos os equipamentos. Assim, medidas de μ FIA com detecção cronoamperométrica foram realizadas para injeções de 2,0 μ L de soluções de UA com concentrações entre 50,0 e 100,0 μ mol L⁻¹ preparadas em PB 0,10 mol L⁻¹ pH 7,4, com as leituras sendo feitas de três maneiras distintas: (1) potenciostato comercial (Figura 105A) e (2-3) sistema eletrônico miniaturizado integrado ao μ TED-5 com transmissão dos dados via USB e recepção em *notebook* pelo programa Arduino (Figura 105B) ou com transmissão dos dados via *bluetooth* e recepção em *smartphone* através do aplicativo desenvolvido (Figura 105C).

Figura 105. Respostas cronoamperométricas obtidas para injeções ($n = 3$) de UA com leitura realizada pelo (A) potenciostato comercial ou pelo sistema eletrônico miniaturizado do μ TED-5 com transmissão dos dados (B) via USB ou (C) *bluetooth*. Potencial aplicado: 0,50 V; eletrólito de suporte: PB 0,10 mol L⁻¹ pH 7,4; volume de injeção: 2,0 μ L.



FONTE: O autor (2018).

De acordo com os sinais transientes mostrados na Figura 105, foram extraídos os valores de corrente obtidos nas três configurações de medidas, as quais são mostradas na Tabela 16. Como forma de comparação, foram calculados os desvios nos valores de corrente e SD da linha base nas medidas obtidas pelo sistema eletrônico miniaturizado do μ TED-5 com relação a análise realizada com o potenciostato comercial (Tabela 16). De acordo com os valores obtidos, foram observados desvios de corrente menores ou iguais a $\pm 6,1\%$ entre as análises realizadas com o sistema de medida do μ TED-5 (tanto para a transmissão via USB quanto via *bluetooth*) e o potenciostato comercial, além de SDs das linhas base muito próximos, confirmando a capacidade do sistema eletrônico

miniaturizado integrado ao μ TED-5 em realizar medidas cronoamperométricas com respostas eletroquímicas proporcionais a concentração do analito e com um desempenho similar ao equipamento comercial. Além disso, foi observado que, tanto a conexão via USB quanto a conexão *bluetooth* não apresentaram falhas na transmissão dos dados das análises, o que poderia causar perda parcial das informações medidas, além de distorções dos sinais transientes ou a inconsistência nos valores de corrente obtidos.

Tabela 16. Comparação dos valores de corrente e SD da linha base obtidos com os eletrodos de grafite para a detecção de UA com o potenciostato comercial e com o sistema eletrônico miniaturizado do μ TED-5 com transmissão dos dados via USB ou *bluetooth*.

Concentração UA ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Potenciostato comercial	Sistema eletrônico miniaturizado - USB (nA)		Sistema eletrônico miniaturizado - <i>bluetooth</i> (nA)	
		Corrente (nA)	Diferença ^a (%)	Corrente (nA)	Diferença ^b (%)
50,0	133 \pm 6	139 \pm 9	+ 4,5	128 \pm 2	- 3,8
100,0	313 \pm 25	311 \pm 25	- 0,6	311 \pm 19	- 0,6
250,0	462 \pm 20	490 \pm 39	+ 6,1	472 \pm 34	+ 2,2
SD linha base (nA)	0,86	0,91		1,20	

^aDiferença nos valores de corrente para o UA obtidos com o sistema eletrônico miniaturizado e transmissão USB com relação ao potenciostato comercial.

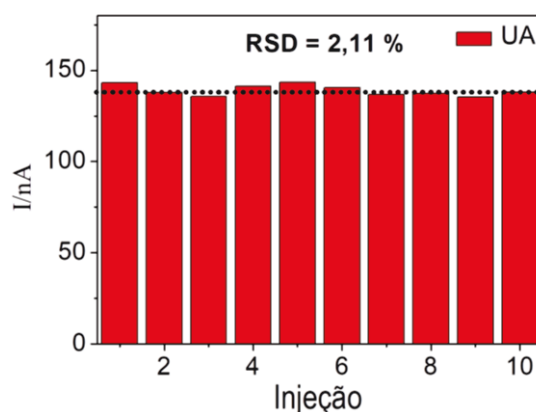
^bDiferença nos valores de corrente para o UA obtidos com o sistema eletrônico miniaturizado e transmissão *bluetooth* com relação ao potenciostato comercial.

FONTE: O autor (2018).

4.5.2.3 Desempenho analítico do μ TED-5 para a determinação de ácido úrico

As características analíticas do μ TED-5 com as medidas baseada em eletrodos de grafite foram estudadas de modo a avaliar a sua aplicação em ensaios de μ FIA com detecção eletroquímica. Inicialmente, foi realizado o estudo de repetibilidade para o monitoramento da estabilidade de todos os componentes do μ TED-5 envolvidos nas medidas eletroquímicas do analito. Assim, foi realizada uma análise com 10 injeções de uma solução contendo 50,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de UA, com a medida cronoamperométrica por μ FIA sendo feita pelo sistema eletrônico miniaturizado do μ TED-5 e transmissão dos dados via USB. De acordo com os valores de corrente obtidos para as adições do analito, foi calculado um RSD de 2,11% (Figura 106), mostrando uma ótima estabilidade dos componentes do dispositivo, tais como o sistema eletrônico miniaturizado (responsável pelas medidas eletroquímicas e transmissão dos dados), as baterias de alimentação, além dos eletrodos de grafite e do canal microfluídico, os quais foram fixados sobre uma base diferente (polímero) dos μ TEDs anteriores.

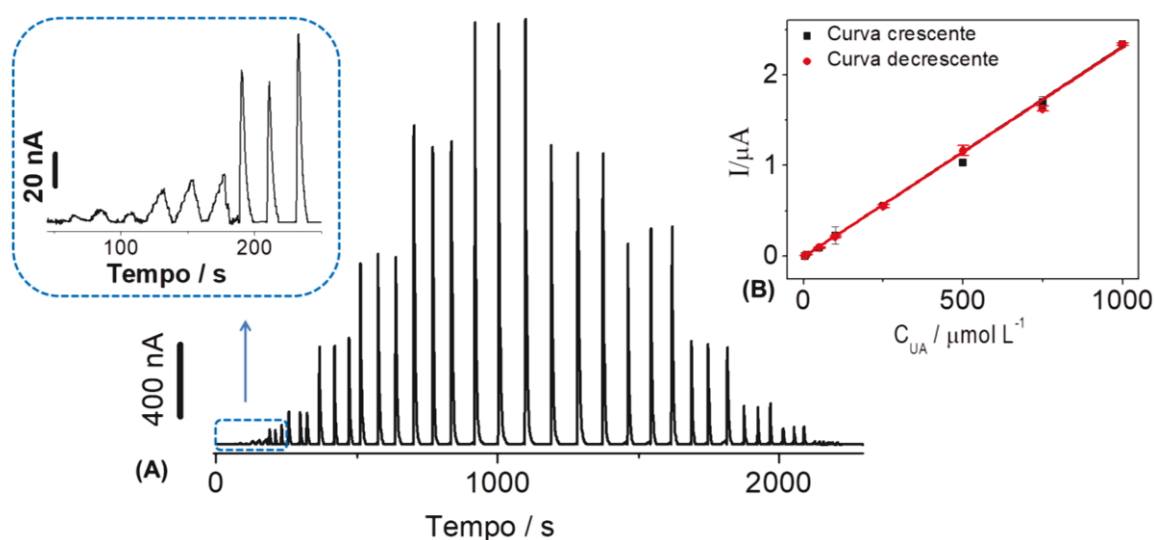
Figura 106. Valores de corrente e RSD obtidos com eletrodos de grafite integrados ao μ TED-5 para injeções ($n = 10$) de $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de UA. Potencial aplicado: $0,50 \text{ V}$; eletrólito de suporte: PB $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,4; volume de injeção: $2,0 \mu\text{L}$.



FONTE: O autor (2018).

Na sequência, uma curva de calibração foi obtida no μ TED-5 com a detecção eletroquímica sendo novamente realizada pela placa miniaturizada e transmissão dos dados via USB. Assim, oito soluções de UA com concentrações entre $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ foram injetadas no dispositivo, com a obtenção dos sinais transientes mostrados na Figura 107A, onde pôde ser observada uma ótima repetibilidade nas respostas medidas ($n = 3$) em cada concentração de UA.

Figura 107. (A) Sinais transientes obtidos para injeções ($n = 3$) de UA com concentrações entre $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ empregando eletrodos de grafite e o sistema eletrônico miniaturizado do μ TED-5. No detalhe, os sinais transientes das três menores concentrações de UA injetadas ($5,0 - 50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$). Potencial aplicado: $0,50 \text{ V}$; eletrólito de suporte: PB $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,4; volume de injeção: $2,0 \mu\text{L}$. (B) Curvas de calibração construídas com os valores de corrente obtidos em A.



FONTE: O autor (2018).

Além disso, com base nos valores de corrente obtidos na medida cronoamperométrica mostrada na Figura 107A, foram construídas curvas de calibração para as injeções do analito com concentrações crescentes e decrescentes (Figura 107B), sendo observadas respostas lineares para a faixa de concentração de UA estudada, além de sensibilidades muito próximas para as curvas de concentrações crescentes ($2,32 \text{ nA } \mu\text{mol}^{-1} \text{ L}$) e decrescentes ($2,31 \text{ nA } \mu\text{mol}^{-1} \text{ L}$) de UA, com um desvio de apenas 0,43% entre elas. Assim, efetuando a média das correntes observadas para ambas as curvas, foi obtida uma equação de regressão linear geral, a qual é descrita a baixo:

$$i(\text{nA}) = -4,81 (\text{nA}) + 2,33C_{\text{UA}} (\mu\text{mol L}^{-1}) \quad (R^2 = 0,9997) \quad (19)$$

Por fim, empregando as equações 7 e 8 (descritas na página 103), os dados da curva de calibração e do desvio da linha base, foram calculados o LD e LQ para a determinação de UA em eletrodos de grafite integrados ao $\mu\text{TED-5}$, com a obtenção de um LD de $1,1 \mu\text{mol L}^{-1}$ e um LQ de $3,7 \mu\text{mol L}^{-1}$. Mesmo sem a otimização dos parâmetros referentes a metodologia de análise, os valores de faixa linear e LD obtidos com o dispositivo proposto foram comparáveis aos apresentados por outros sistemas de detecção eletroquímica de UA, com valores melhores em alguns casos e inferiores em outros, como mostrado na Tabela 17, indicando assim um bom desempenho analítico do sistema eletrônico miniaturizado e dos eletrodos de grafite integrados ao $\mu\text{TED-5}$.

Tabela 17. Comparação da faixa linear e LD obtidos para a determinação de UA pelos eletrodos de grafite integrados ao $\mu\text{TED-5}$ com outros trabalhos na literatura.

Eletrodo	Faixa linear ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	LD ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Ref.
Au-Cu ₂ O/rGO/GCE	100,0 – 900,0	6,5	485
Co-CeO ₂ /GCE	1,0 – 2200,0	0,1	486
UOx-poly(4-ASA)-PB-SPE	10,0 – 200,0	3,0	487
CL-TiN/GCE	10,0 – 300,0	0,3	488
Pd/RGO/GCE	6,0 – 469,5	1,6	489
MoS ₂ -graphene/ITO	5,0 – 60,0	0,4	490
GO/Fe ₃ O ₄ @SiO ₂ /SPE	0,8 – 300,0	0,6	491
Eletrodos de grafite/ $\mu\text{TED-5}$	5,0 – 1000,0	1,1	Este trabalho

Abreviações: Au-Cu₂O/rGO/GCE – eletrodo de carbono vítreo modificado com óxido de grafeno reduzido e Au-Cu₂O. UOx-poly(4-ASA)-PB-SPE – Eletrodo de grafite impresso modificado com azul da prússia, poli(ácido 4-aminosalicílico) e uricase. CL-TiN/GCE – eletrodo de carbono vítreo modificado com nitreto de titânio tipo crisântemo. Pd/RGO/GCE - eletrodo de carbono vítreo modificado com óxido de grafeno reduzido e nanocúbiclos de Pd. MoS₂-graphene/ITO – eletrodo de vidro recoberto com óxido de estanho e índio e modificado com nanofolhas de grafeno e MoS₂. GO/Fe₃O₄@SiO₂/SPE - Eletrodo impresso modificado com óxido de grafeno, Fe₃O₄ e SiO₂. Co-CeO₂/GCE - eletrodo de carbono vítreo modificado com nanopartículas de CeO₂ dopadas com Co.

FONTE: O autor (2018). Valores obtidos das referências 485-491.

4.5.3 Determinação de hidroclorotiazida com eletrodo impresso

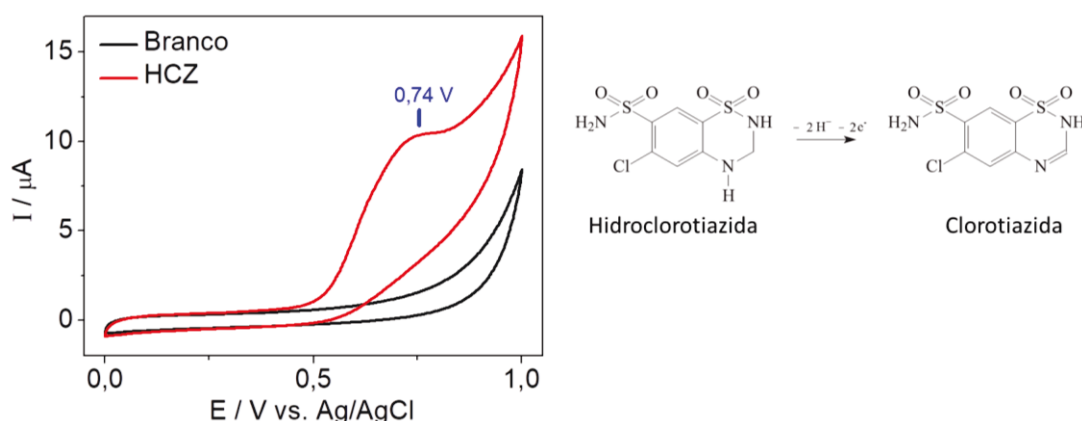
Os eletrodos impressos (SPE) são amplamente utilizados em medidas eletroquímicas para os mais variados propósitos e aplicações, devido a características como flexibilidade, processo de fabricação automatizado e uma ampla diversidade de materiais disponíveis. Normalmente, os SPE incluem uma configuração com três eletrodos (trabalho, referência e contra eletrodo) fabricados com tintas de diferentes composições (sendo a tinta a base de carbono a mais utilizada) em bases poliméricas ou cerâmicas.⁴⁹²

Considerando que até essa altura do projeto, os SPE ainda não tinham sido empregados em análises com o μ TED, foi realizada a integração de um eletrodo de carbono impresso com o μ TED-5, de modo a estudar o comportamento deste eletrodo em medidas eletroquímicas com o dispositivo microfluídico proposto e também avaliar o desempenho do sistema eletrônico miniaturizado para análises com um segundo tipo de eletrodo (além do eletrodo de grafite empregado anteriormente). A região de detecção do SPE utilizado nas análises apresentou dimensões de 7 x 7 mm e foi delimitada por pequenos pedaços de fios de algodão. As demais configurações do μ TED-5 (tal como número de fios que compõe o canal microfluídico, diferença de altura entre os reservatórios, etc) foram as mesmas empregadas para a análise de UA com os eletrodos de grafite. Para avaliação da resposta eletroquímica, foi utilizado como analito o HCZ e como eletrólito de suporte PB 0,10 mol L⁻¹ pH 7,4.

4.5.3.1 Comportamento eletroquímico da hidroclorotiazida

Inicialmente, o comportamento eletroquímico da HCZ no SPE foi avaliado através da obtenção de um CV entre 0,00 e 1,00 V vs. Ag/AgCl a partir de uma solução contendo 1,0 mmol L⁻¹ do analito, o qual foi comparado com o CV do eletrólito (PB 0,10 mol L⁻¹ pH 7,4) para a mesma faixa de potencial. No voltamograma obtido para a HCZ foi observado um processo de oxidação em 0,74 V (Figura 108), o qual corresponde a formação da clorotiazida devido a oxidação irreversível da HCZ por um mecanismo envolvendo 2e⁻ e 2H⁺,^{493,494}. Além disso, o CV correspondente ao eletrólito (prova em branco) não mostrou nenhum processo faradaico, indicando um sistema livre de contaminações e possibilitando desta forma, a realização de análises cronoamperométricas do analito no SPE integrado ao μ TED-5.

Figura 108. CVs obtidos com o SPE integrado no μ TED-5 para o eletrólito de suporte (linha preta) e para solução contendo $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de HCZ. A reação de oxidação do HCZ também é mostrada. Eletrólito de suporte: PB $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,4; velocidade de varredura: 50 mV s^{-1} .

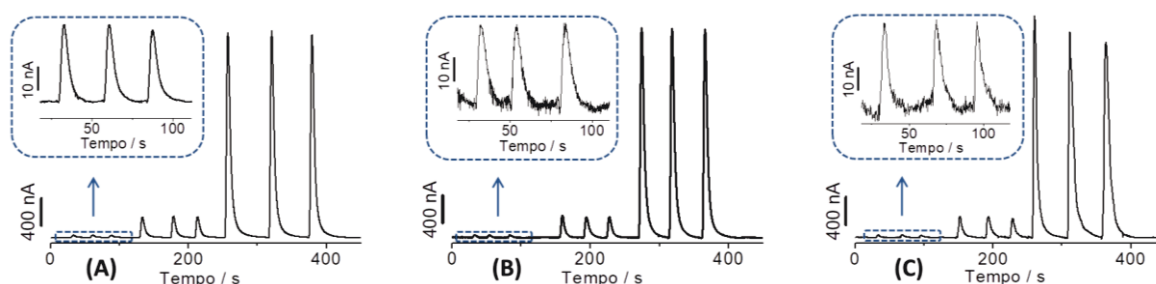


FONTE: O autor (2018). Reações adaptadas da referência 493.

4.5.3.2 Comparação das respostas cronoamperométricas do eletrodo impresso

Assim como foi realizado para os eletrodos de grafite, foi feita uma comparação da resposta eletroquímica do SPE (integrado ao dispositivo microfluídico) com relação aos desvios nos valores de corrente do analito e da linha base observados nas análises de HCZ feitas com o sistema eletrônico miniaturizado do μ TED-5 e com o potenciostato comercial. Desta forma, foram realizadas medidas por μ FIA com detecção cronoamperométrica em SPE de soluções contendo HCZ com concentrações entre $10,0$ e $750,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ preparadas em PB $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,4, com a obtenção dos sinais transientes através do potenciostato comercial (Figura 109A) e do sistema eletrônico miniaturizado integrado ao μ TED-5, com transmissão dos dados via USB (Figura 109B) ou via *bluetooth* (Figura 109C).

Figura 109. Respostas cronoamperométricas obtidas com o SPE para injeções ($n = 3$) de HCZ com leitura realizada pelo (A) potenciostato comercial ou pelo sistema eletrônico miniaturizado do μ TED-5 com transmissão dos dados (B) via USB ou (C) *bluetooth*. Potencial aplicado: $0,80 \text{ V}$; eletrólito de suporte: PB $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,4; volume de injeção: $2,0 \text{ } \mu\text{L}$.



FONTE: O autor (2018).

Comparando os valores de corrente obtidos pelo potenciostato comercial aos apresentados pelo sistema eletrônico miniaturizado do μ TED-5, foram observados desvios (nos valores de corrente) entre $\pm 1,7$ e $2,7\%$ para os sinais transientes gerados através da análise realizada no μ TED-5 com transmissão dos dados via USB e entre $\pm 1,2$ e $2,7\%$ para o ensaio monitorado pelo aplicativo desenvolvido através de conexão *bluetooth* (Tabela 18). Desta forma, os ensaios realizados para a HCZ indicaram uma boa integração do SPE ao canal microfluídico e ao sistema de medida miniaturizado do μ TED-5, o qual apresentou respostas eletroquímicas muito próximas ao potenciostato comercial, confirmando a possibilidade na realização de medidas cronoamperométricas utilizando a configuração avaliada.

Tabela 18. Comparação dos valores de corrente e SD da linha base obtidos com o SPE para a detecção da HCZ com o potenciostato comercial e com o sistema eletrônico miniaturizado do μ TED-5 com transmissão dos dados via USB ou *bluetooth*.

Concentração HCZ ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Potenciostato comercial	Sistema eletrônico miniaturizado - USB (nA)		Sistema eletrônico miniaturizado - <i>bluetooth</i> (nA)	
	Corrente (nA)	Corrente (nA)	Diferença ^a (%)	Corrente (nA)	Diferença ^b (%)
10,0	37 ± 1	38 ± 1	+ 2,7	36 ± 1	- 2,7
100,0	287 ± 8	292 ± 12	+ 1,7	282 ± 20	- 1,7
1000,0	2819 ± 27	2874 ± 10	+ 2,0	2853 ± 180	+ 1,2
SD linha base (nA)	0,24	1,30		1,87	

^aDiferença nos valores de corrente para a HCZ obtidos com o sistema eletrônico miniaturizado e transmissão USB com relação ao potenciostato comercial.

^bDiferença nos valores de corrente para a HCZ obtidos com o sistema eletrônico miniaturizado e transmissão *bluetooth* com relação ao potenciostato comercial.

FONTE: O autor (2018).

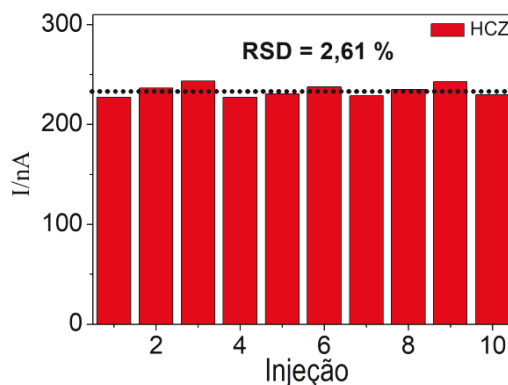
Além disso, as medidas cronoamperométricas realizadas apresentaram valores de SD da linha base de 0,24 nA para o potenciostato comercial e de 1,30 e 1,87 nA para as análises feitas com o sistema eletrônico miniaturizado através do monitoramento e envio dos dados via USB e *bluetooth*, respectivamente.

4.5.3.3 Desempenho analítico do μ TED-5 para a determinação de hidroclorotiazida

Primeiramente, foi avaliada a estabilidade das medidas eletroquímicas realizadas por μ FIA com o sistema eletrônico miniaturizado integrado ao μ TED-5 e ao SPE. Para isso, foram obtidas respostas cronoamperométricas para injeções consecutivas de uma solução contendo $75,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de HCZ preparada em PB $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,4. De acordo com as corrente obtidas para 10 injeções do analito com transmissão dos dados via USB, foram observadas pequenas variações entre os valores medidos, sendo calculado um

RSD de apenas 2,61%. (Figura 110), indicando assim uma estabilidade adequada na resposta eletroquímica de todo o sistema de medida (incluindo o sistema eletrônico miniaturizado e o SPE), além de um fluxo do eletrólito livre de oscilações e de uma limpeza completa da zona de detecção do eletrodo após cada injeção do analito.

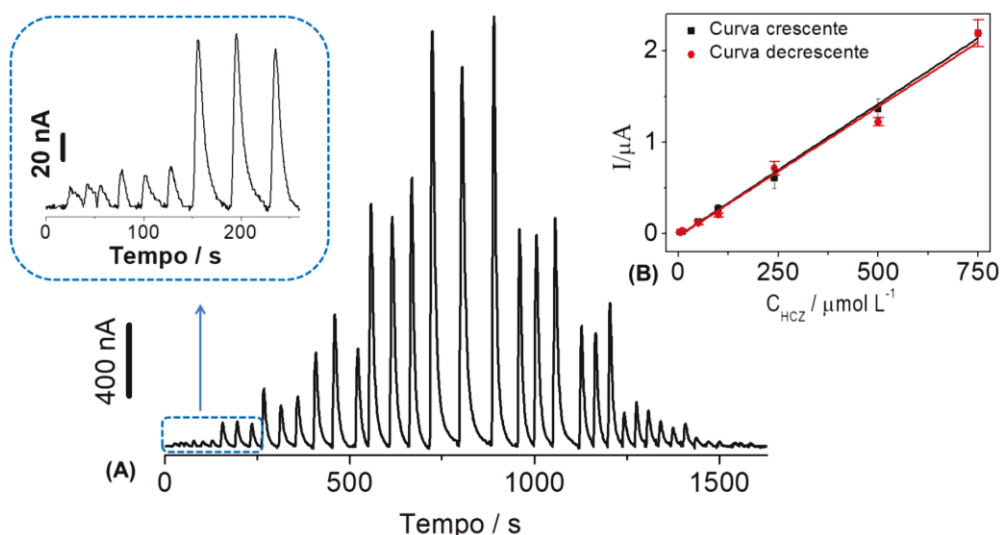
Figura 110. Valores de corrente e RSD obtidos com o SPE integrado ao μ TED-5 para injeções ($n = 10$) de $75,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de HCZ. Potencial aplicado: $0,80 \text{ V}$; eletrólito de suporte: PB $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,4; volume de injeção: $2,0 \mu\text{L}$.



FONTE: O autor (2018).

Em seguida, uma curva de calibração foi obtida com o SPE integrado ao μ TED-5, sendo usada a conexão USB para a transmissão e monitoramento dos dados das análises. Desta forma, foram realizadas injeções em triplicata de soluções de HCZ com concentrações entre $5,0$ e $750,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, com a obtenção, por cronoamperometria, dos sinais transientes mostrados na Figura 111A.

Figura 111. (A) Sinais transientes obtidos para injeções ($n = 3$) de HCZ com concentrações entre $5,0$ e $750,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ empregando um SPE integrado ao μ TED-5. No detalhe, os sinais transientes das três menores concentrações de HCZ injetadas ($5,0 - 50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$). Potencial aplicado: $0,80 \text{ V}$; eletrólito de suporte: PB $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,4; volume de injeção: $2,0 \mu\text{L}$. (B) Curvas de calibração construídas com os valores de corrente obtidos em A.



FONTE: O autor (2018).

Na análise realizada, foi observada uma relação linear entre os valores de corrente medidos e as concentrações de HCZ ao longo de toda a faixa estudada (5,0 e 750,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$), sendo obtida a seguinte equação de regressão linear:

$$i(\text{nA}) = -24,07 (\text{nA}) + 2,85C_{\text{HCZ}} (\mu\text{mol L}^{-1}) (R^2 = 0,9943) \quad (20)$$

Além disso, as respostas eletroquímicas observadas para a HCZ mostraram a ausência de envenenamento da superfície do eletrodo impresso ou efeito de memória, indicadas pela obtenção de curvas de calibração com sensibilidades praticamente iguais para as injeções de HCZ com concentrações crescentes (2,88 nA μmol^{-1} L) e decrescentes (2,82 nA μmol^{-1} L) (Figura 111B), com um desvio entre as curvas de apenas 2,1%.

Por fim, de acordo com os dados obtidos com a curva de calibração e utilizando as equações 7 e 8 (descritas na página 103), foi calculado um LD e LQ de 1,1 e 3,7 $\mu\text{mol L}^{-1}$ respectivamente, para a determinação de HCZ utilizando o SPE integrado ao $\mu\text{TED-5}$. Quando comparado com outros trabalhos relatados na literatura que também empregaram a detecção eletroquímica para a determinação de HCZ, a análise realizada com o $\mu\text{TED-5}$ apresentou uma faixa linear mais ampla e o um valor de LD similar (Tabela 19), mostrando a grande potencialidade que o dispositivo microfluídico construído nesta parte do projeto tem em ser utilizado juntamente com SPEs, visto que a determinação de HCZ foi a primeira tentativa de integração deste tipo de eletrodo aos μTEDs do projeto e que os parâmetros relativos às medidas eletroquímicas ainda não tinham sido otimizados.

Tabela 19. Comparação da faixa linear e LD obtidos para a determinação de HCZ com o SPE integrado ao $\mu\text{TED-5}$ e com outros trabalhos na literatura.

Eletrodo	Faixa linear ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	LD ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Ref.
EPPGE	4,0 – 140,0	3,3	495
Eletrodo de pasta de carbono	2,0 – 70,8	0,8	496
NMN	13,9 – 167,0	7,9	497
BDDE	4,0 – 83,0	1,2	494
Eletrodo de ta-C:N	3,0 – 9,8	2,5	498
GCE/MWCNT	0,1 – 20,0	0,03	499
Eletrodo de Ta/grafeno	0,5 – 400,0	0,4	500
SPE/ $\mu\text{TED-5}$	5,0 – 750,0	1,1	Este trabalho

Abreviações: EPPGE – Eletrodo de grafite de lápis pré-tratado eletroquimicamente. NMN – eletrodo de níquel modificado com hidróxido de níquel. BDDE – Eletrodo de diamante dopado com boro. Eletrodo de ta-C:N – eletrodo de carbono amorfo tetraédrico contendo nitrogênio. GCE/MWCNT – eletrodo de carbono vítreo modificado com nanotubos de carbono de paredes múltiplas

FONTE: O autor (2018). Valores obtidos das referências 494-500.

4.5.4 Separação cromatográfica e determinação de ácido ascórbico e epinefrina com eletrodos de ouro

O desempenho do μ TED-5 foi avaliado para uma terceira configuração de análise, a qual tinha por objetivo a separação cromatográfica e detecção eletroquímica de AA e EP. Assim como no μ TED-4, a separação dos analitos foi feita diretamente no canal microfluídico do dispositivo através do mecanismo de troca iônica, devido a presença de grupos carboxílicos (com carga negativa) nos fios de algodão do canal microfluídico e as diferenças nos estados das moléculas dos analitos na fase móvel (tampão acetato pH 3,8), com o AA (pK_a de 4,17)⁴⁷⁰ estando majoritariamente neutro e a epinefrina (pK_a de 8,89)⁵⁰¹ totalmente protonada. Posteriormente, as espécies já separadas foram detectadas por cronoamperometria empregando eletrodos de Au construídos diretamente sobre os fios de algodão do mesmo canal microfluídico responsável pela separação dos analitos.

Desta forma, para a determinação seletiva de AA e EP de acordo com a metodologia descrita acima, foi necessário que o sistema de medida apresentasse uma resposta estável por longos períodos de análise (superiores aos ensaios de μ FIA realizados anteriormente com os eletrodos de grafite e impresso), permitindo assim, uma avaliação mais completa dos componentes do μ TED-5, tal como o sistema eletrônico miniaturizado, o sistema de transmissão e recepção dos dados, a duração das baterias, entre outros.

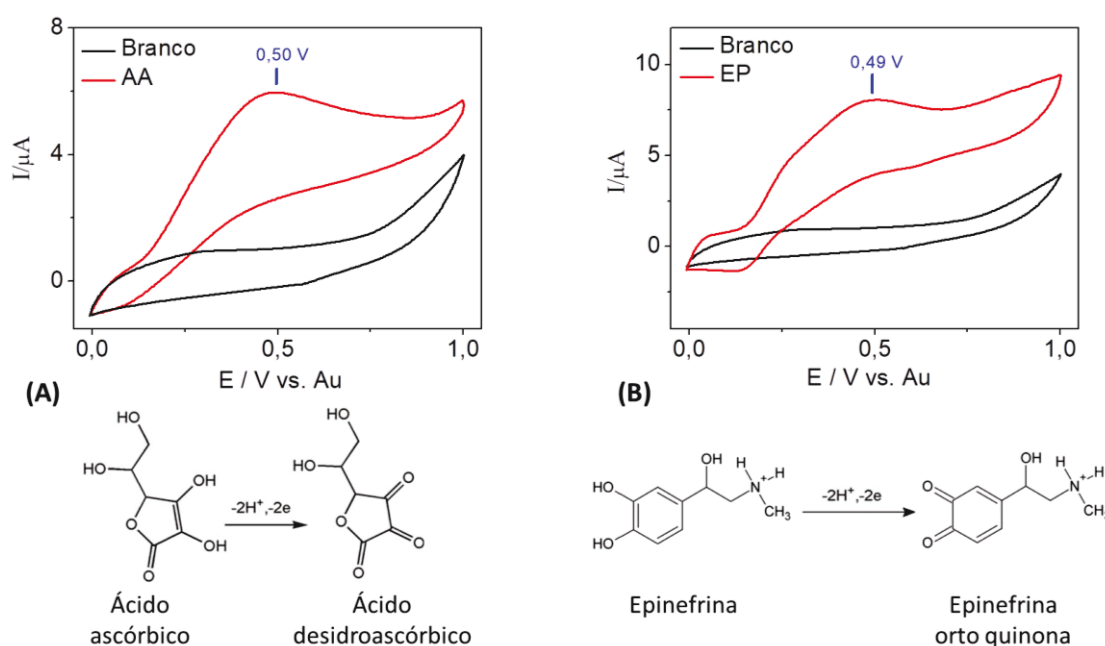
As configurações, dimensões e etapas de montagem do sistema de análise construído sobre o μ TED-5 foram as mesmas utilizadas na fabricação do dispositivo descrito na parte IV do projeto (μ TED-4), tal como metodologia de tratamento dos fios de algodão com ácido cítrico, construção do canal microfluídico principal e dos eletrodos de Au, quantidade e comprimento dos fios de algodão que compõe os microcanais, distâncias entre os canais microfluídicos, tamanho da região de separação e diferenças de altura entre os reservatórios. Para a realização das separações de AA e EP e detecção eletroquímica, foi utilizado como eletrólito de suporte (e fase móvel) tampão acetato pH 3,8 com forças iônicas entre $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ e $1,0 \text{ mol L}^{-1}$.

4.5.4.1 Comportamento eletroquímico do ácido ascórbico e epinefrina

Inicialmente, foi avaliado o comportamento eletroquímico individual do AA e EP nos eletrodos de Au construídos sobre os fios de algodão de C_m e montados sobre a base polimérica portátil do μ TED-5. Foram obtidos CVs entre 0,00 e 1,00 V vs. Au em tampão acetato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ pH 3,8 antes (prova em branco) e após a adição de $1,0 \text{ mmol}$

L^{-1} de AA ou $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de EP. As análises realizadas apenas com eletrólito de suporte não mostraram nenhum processo relacionado a oxidação ou redução de possíveis espécies contaminantes ou do Au dos eletrodos. A CV do AA apresentou um processo de oxidação em $0,50 \text{ V}$, o qual corresponde a perda de 2e^- e 2H^+ pela formação do ácido desidroascórbico a partir do AA (Figura 112A). Por fim, o voltamograma da EP também mostrou apenas um processo de oxidação (em $0,49 \text{ V}$), o qual se deve a uma reação envolvendo 2e^- e 2H^+ com a conversão da EP em epinefrina orto (Figura 112B).^{502,503}

Figura 112. CVs obtidos com os eletrodos de Au integrados no $\mu\text{TED-5}$ para o eletrólito de suporte (linhas pretas) e para (A) $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de AA e (B) $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de EP (linhas vermelhas). As reações de oxidação das espécies também são mostradas. Eletrólito de suporte: tampão acetato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ pH 3,8; velocidade de varredura: 50 mV s^{-1} .

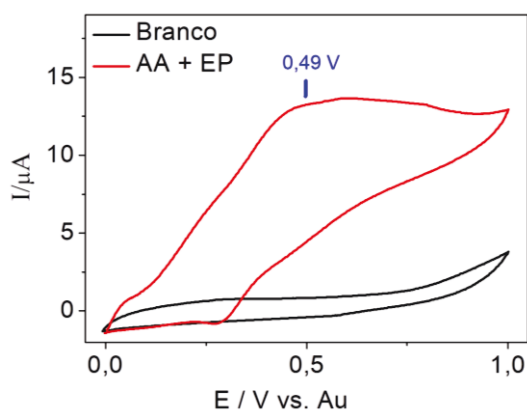


FONTE: O autor (2018). Reações adaptadas das referências 465 e 502.

Assim, os CVs individuais obtidos para o AA e EP apresentaram processos de oxidação com potenciais muito próximos, sugerindo a incapacidade dos eletrodos de Au na detecção eletroquímica direta e seletiva dos analitos. Para a confirmação desta observação, análises de CV entre $0,00$ e $1,00 \text{ V vs. Au}$ foram realizadas para uma solução contendo a mistura das espécies ($1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de AA e $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de EP) e para o eletrólito de suporte (prova em branco), composto por tampão acetato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ pH 3,8. No CV obtido em solução contendo apenas o eletrólito de suporte, não houve a formação de nenhum processo faradaico (Figura 113). Já para o CV da mistura dos analitos, foi observado apenas um processo de oxidação largo e mal definido no sentido anódico de varredura do potencial, com uma corrente máxima em torno de $0,49 \text{ V}$, impossibilitando a identificação individual dos processos de oxidação para cada analito

com os eletrodos de Au e a determinação eletroquímica seletiva das espécies sem a aplicação de uma separação cromatográfica prévia.

Figura 113. CVs obtidos com os eletrodos de Au integrados ao μ TED-5 para o eletrólito de suporte (linha preta) e para uma mistura de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de AA e $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de EP (linha vermelha). Eletrólito de suporte: tampão acetato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ pH 3,8; velocidade de varredura: 50 mV s^{-1} .



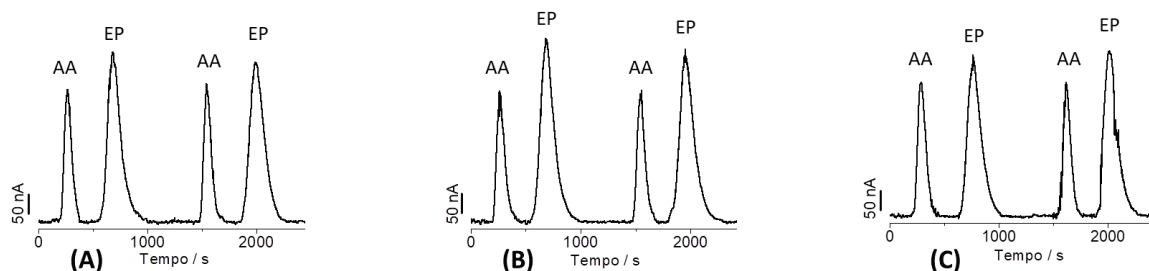
FONTE: O autor (2018).

4.5.4.2 Comparação das respostas cronoamperométricas com eletrodos de ouro

Inicialmente, a avaliação da resposta eletroquímica obtida para AA e EP pelo sistema eletrônico miniaturizado do μ TED-5 integrado aos eletrodos de Au foi feita através da comparação com a análise realizada nas mesmas condições pelo potenciostato comercial. Para isso, foram realizadas medidas de uma solução contendo $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de AA e $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de EP (preparada em tampão acetato $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ pH 3,8) com metodologia de separação e detecção das espécies baseada na eluição por gradiente igual a empregada nas análises de AA e DA descritas na parte IV do trabalho.

Resumidamente, $2,0 \mu\text{L}$ da mistura de AA e EP foi injetada em C_m , com a região de separação possuindo um comprimento de 35 mm e com R_i e R_{ax2} contendo durante todo o tempo da análise tampão acetato pH 3,8 com FI de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ e $1,0 \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente. Na etapa de eluição do AA, foi adicionado em R_{ax1} tampão acetato pH 3,8 com FI de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$. Na sequência, para a eluição da EP, a solução em R_{ax1} foi substituída pelo mesmo tampão, mas com FI de $1,0 \text{ mol L}^{-1}$. Por fim, após a detecção da DA, tampão acetato pH 3,8 com FI de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ foi novamente adicionado em R_{ax1} , de modo a preparar o sistema para a próxima injeção dos analitos. Os sinais transientes correspondentes as análises de AA e EP são mostrados na Figura 114, os quais foram obtidos com o potenciostato comercial (Figura 114A) e com o sistema eletrônico miniaturizado integrado ao μ TED-5 com monitoramento e transmissão do dados via USB (Figura 114B) ou *bluetooth* (Figura 114C).

Figura 114. Respostas cronoamperométricas obtidas com eluição por gradiente para injeções ($n = 2$) de solução contendo $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de AA e $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de EP com leitura realizada pelo (A) potenciostato comercial ou pelo sistema eletrônico miniaturizado integrado ao $\mu\text{TED-5}$ com transmissão dos dados (B) via USB ou (C) *bluetooth*. Potencial aplicado: $0,60 \text{ V}$; eletrólito de suporte: tampão acetato pH 3,8; volume de injeção: $2,0 \mu\text{L}$.



FONTE: O autor (2018).

Nos ensaios realizados com o sistema eletrônico miniaturizado integrado ao $\mu\text{TED-5}$, ambas as formas de conexão (USB e *bluetooth*) não apresentaram problemas (tais como travamento ou lentidão) na transmissão dos dados durante todo o período das análises, o que poderia causar distorções nos sinais transientes dos analitos e perda de parte dos dados medidos.

Observando os valores de corrente obtidos para os analitos, foi calculado um desvio de $\pm 2,9$ e $2,4\%$ para AA e de $\pm 5,2$ e $2,4\%$ para EP nos ensaios realizados com o sistema eletrônico miniaturizado integrado ao $\mu\text{TED-5}$ com transmissão dos dados via USB e *bluetooth*, respectivamente, quando comparado com os valores de corrente obtidos com o potenciostato comercial (Tabela 20).

Tabela 20. Comparação dos valores de corrente e SD da linha base obtidos com os eletrodos de Au para a separação e detecção de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de AA e $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de EP com o potenciostato comercial e com o sistema eletrônico miniaturizado do $\mu\text{TED-5}$ com transmissão dos dados via USB ou *bluetooth*.

Espécie	Potenciostato comercial	Sistema eletrônico miniaturizado – USB (nA)		Sistema eletrônico miniaturizado – <i>bluetooth</i> (nA)	
	Corrente (nA)	Corrente (nA)	Diferença ^a (%)	Corrente (nA)	Diferença ^b (%)
AA	379 ± 11	368 ± 2	- 2,9	370 ± 1	- 2,4
EP	462 ± 19	486 ± 28	+ 5,2	451 ± 7	- 2,4
SD linha base (nA)	0,41	0,83		1,10	

^aDiferença nos valores de corrente para o AA e EP obtidos com o sistema eletrônico miniaturizado e transmissão USB com relação ao potenciostato comercial.

^bDiferença nos valores de corrente para o AA e EP obtidos com o sistema eletrônico miniaturizado e transmissão *bluetooth* com relação ao potenciostato comercial.

FONTE: O autor (2018).

Além disso, as medidas apresentaram valores de SD da linha base de $0,41 \text{ nA}$ para o potenciostato comercial e de $0,83$ e $1,10 \text{ nA}$ para as análises realizadas no

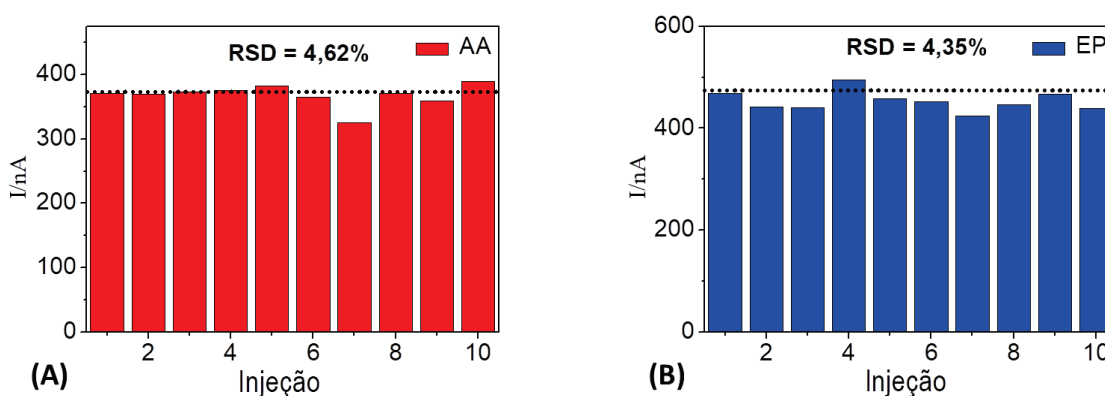
sistema de medida do μ TED-5 com monitoramento e transmissão dos dados via USB e *bluetooth*, respectivamente. Assim, as comparações mostraram uma eficiente integração dos eletrodos de Au com o sistema eletrônico miniaturizado e a possibilidade na realização de separações cromatográficas e detecção eletroquímica seletiva de AA e EP no μ TED-5.

4.5.4.3 Desempenho analítico do μ TED-5 para a separação e determinação de ácido ascórbico e epinefrina

A determinação de misturas de AA e EP por cronoamperometria com separação prévia das espécies no canal microfluídico do μ TED-5 apresentou um tempo total de análise significativamente superior as medidas por μ FIA realizadas anteriormente no dispositivo, exigindo assim, uma grande estabilidade no desempenho dos componentes do μ TED-5 por longos períodos de análise. Desta forma, estudos foram feitos para a avaliação da estabilidade e linearidade (em função da concentração dos analitos) das respostas eletroquímicas obtidas com o dispositivo construído nesta parte do projeto.

Inicialmente, foi realizado o estudo de repetibilidade, com a separação e detecção de uma solução contendo $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de AA e $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de EP, com as leituras sendo feitas no μ TED-5 através do sistema eletrônico miniaturizado e utilizando a conexão USB para o transmissão dos dados das análises. Foram realizadas 10 injeções ($2,0 \mu\text{L}$) da mistura dos analitos, com a separação das espécies sendo feitas com eluição por gradiente a partir das soluções de tampão acetato pH 3,8 com diferentes FI. Com base nos valores de corrente obtidos, foram calculados RSDs de 4,62 e 4,35% para o AA e EP (Figura 115), respectivamente, mostrando assim, uma ótima estabilidade de todos os componentes do μ TED-5 por um longo período de tempo (aproximadamente 150 minutos de análise contínua).

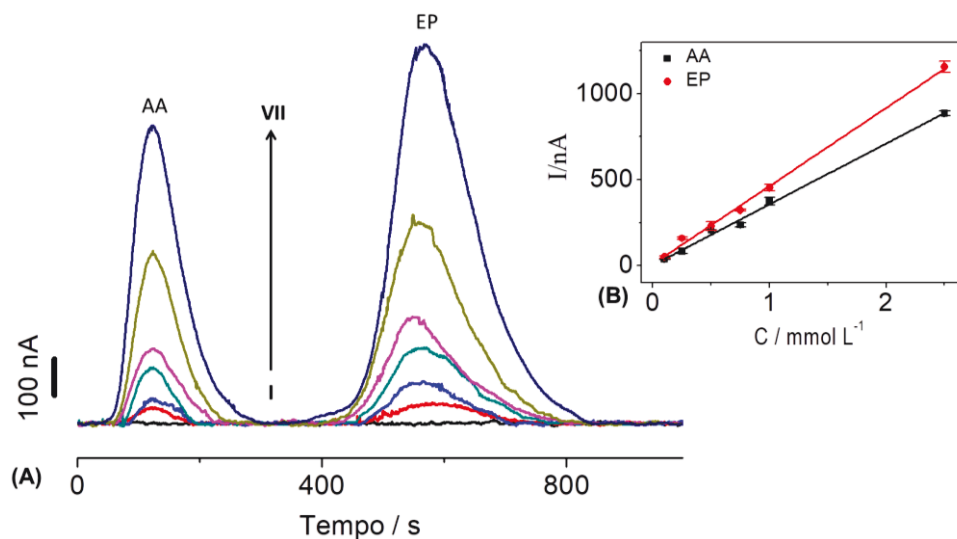
Figura 115. Valores de corrente e RSDs obtidos com os eletrodos de Au integrados ao μ TED-5 para $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de AA e $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de EP. Potencial aplicado: 0,60 V; eletrólito de suporte: tampão acetato pH 3,8; volume de injeção: $2,0 \mu\text{L}$.



FONTE: O autor (2018).

Além do monitoramento das respostas eletroquímicas para uma única concentração de AA e EP, o sistema de medida do μ TED-5 integrado aos eletrodos de Au também foi avaliado para a realização de análises com diferentes concentrações dos analitos, de modo a estudar a linearidade nas respostas obtidas pelo dispositivo nestas condições. Para isso, foram construídas curvas de calibração através da realização de separações cromatográficas (com eluição por gradiente) no fios de algodão de C_m e detecção cronoamperométrica de AA e EP com concentrações entre 0,10 e 2,50 mmol L⁻¹ (para ambas as espécies), as quais foram preparadas em tampão acetato 1,0 mmol L⁻¹ pH 3,8. As respostas eletroquímicas foram obtidas com o sistema eletrônico miniaturizado integrado ao μ TED-5 com transmissão dos dados via conexão USB. Para cada concentração dos analitos, as análises foram feitas em triplicata, com os sinais transientes correspondentes a detecção de uma das injeções de cada concentração sendo mostradas na Figura 116A.

Figura 116. (A) Sinais transientes obtidos com os eletrodos de Au integrados ao sistema de medida do μ TED-5 para a separação e detecção eletroquímica de soluções contendo misturas de AA e EP com as seguintes concentrações de ambas as espécies: (I) 0,00, (II) 0,10, (III) 0,25, (IV) 0,50, (V) 0,75, (VI) 1,00 e (VII) 2,50 mmol L⁻¹. (B) Curvas de calibração construídas a partir das respostas obtidas em A. Potencial aplicado: 0,60 V; eletrólito de suporte: tampão acetato pH 3,8; volume de injeção: 2,0 μ L.



FONTE: O autor (2018).

Com base nos valores de correntes medidos nas análises de AA e EP, foram observadas respostas lineares ao longo da faixa de concentração avaliada (entre 0,10 e 2,50 mmol L⁻¹) para ambas as espécies (Figura 116B), com a obtenção das seguintes equações de regressão linear:

$$\text{AA: } i(\text{nA}) = 3,08 (\text{nA}) + 353,9 C_{\text{AA}} (\text{mmol L}^{-1}) \quad (R^2 = 0,9948) \quad (21)$$

$$\text{EP: } i(\text{nA}) = 8,26 (\text{nA}) + 454,9 C_{\text{EP}} (\text{mmol L}^{-1}) \quad (R^2 = 0,9963) \quad (22)$$

Por fim, os valores de LD e LQ para cada analito foram calculados empregando os dados da curva de calibração e as equações 7 e 8 (descritas na página 103). Para o AA e EP, foram obtidos LDs de 6,8 e 5,3 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e LQs de 22,7 e 17,6 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente. Quando comparado com outros sistemas eletroquímicos (voltamétricos) de detecção simultânea de AA e EP (visto que ainda não existem exemplos na literatura de dispositivos microfluídicos desenvolvidos para a separação de AA e EP com detecção amperométrica), os LDs calculados para o AA e EP através das análises realizadas com os eletrodos de Au integrados ao $\mu\text{TED-5}$ apresentaram valores mais altos, além de uma faixa linear similar aos outros sistemas relatados na literatura (Tabela 21).

Tabela 21. Comparação da faixa linear e LDs obtidos para a separação e detecção de AA e EP com os eletrodos de Au integrados ao $\mu\text{TED-5}$ e com outros trabalhos da literatura.

Eletrodo	Faixa linear ($\mu\text{mol L}^{-1}$)		LD ($\mu\text{mol L}^{-1}$)		Ref.
	AA	EP	AA	EP	
Au-NPs/poly(BCG)/GCE	5,0 – 1320,0	4,0 – 903,0	0,2	0,01	504
Au/ZnO/PPy/RGO/GCE	2,0 – 950,0	0,6 – 500,0	0,2	0,06	505
Grafeno/GCE	10,0 – 6000,0	0,2 – 100,0	3,0	0,001	506
PBCACPMGCE	1,0 – 2000,0	0,2 – 175,0	0,4	0,03	507
CA/GCE	20,0 – 1000,0	2,0 – 80,0	7,0	0,2	508
ABB/GCE	2,0 – 1970,0	0,1 – 64,0	0,01	0,007	509
β -NiS@rGO/AuNS/GCE	1,0 – 1000,0	2,0 – 1000,0	0,7	1,3	510
Eletrodos de Au/ $\mu\text{TED-5}$	100,0 – 2500,0	100,0 – 2500,0	6,8	5,3	Este trabalho

Abreviaturas: Au-NPs/poly(BCG)/GCE – eletrodo de carbono vítreo modificado com verde bromocresol e nanopartículas de Au. Au/ZnO/PPy/RGO/GCE – eletrodo de carbono vítreo modificado com óxido de grafeno reduzido, polipirrol, óxido de zinco e nanopartículas de Au. Grafeno/GCE – eletrodo de carbono vítreo modificado com grafeno. PBCACPMGCE – eletrodo de carbono vítreo modificado com poli (3,3'-bis[N,N-bis(carboximetil)aminometil]-o-cresolsulfonaftaleína). CA/GCE – eletrodo de carbono vítreo modificado com ácido cafeico. ABB/GCE – eletrodo de carbono vítreo modificado com poli(Adizol Black B). β -NiS@rGO/AuNS/GCE - eletrodo de carbono vítreo modificado com sulfeto de níquel, óxido de grafeno reduzido e nanoesferas de Au.

FONTE: O autor (2018). Valores obtidos das referências 504-510.

Entretanto, o desempenho do $\mu\text{TED-5}$ (especialmente no valor de LD) para a determinação de misturas de AA e EP pode ser melhorado com a realização de estudos de otimização dos parâmetros de análise, tal como o potencial de oxidação empregado nas medidas cronoamperométricas. Porém, os estudos conduzidos nesta parte do projeto não tinham como objetivo principal a obtenção de um LD extremamente baixo, mas sim, estudar a integração de um terceiro tipo de eletrodo (Au) ao dispositivo desta parte do projeto e realizar avaliações com relação ao comportamento dos componentes do $\mu\text{TED-5}$ (sistema eletrônico miniaturizado, baterias, sistemas de transmissão e recepção dos dados) em ensaios que exijam um longo tempo de duração (tal como separações

cromatográficas de compostos e construção de curvas de calibração). Assim, através dos estudos realizados, foi observado um desempenho adequado do μ TED-5 para as medidas realizadas com os eletrodos de Au e uma ótima estabilidade dos componentes do dispositivo para longo períodos de análises.

5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Neste trabalho foi realizada a construção e desenvolvimento de cinco dispositivos microfluídicos baseados em fios de algodão e detecção eletroquímica com o objetivo de realizar análises em microfluxo de uma forma simples e barata. Os materiais empregados para a construção dos dispositivos eram, em sua grande maioria, de baixo custo e de fácil aquisição. Os processos de fabricação foram caracterizados pela baixa necessidade de equipamentos, com a maior parte das etapas exigindo apenas a montagem dos componentes. Com isso, os μ TEDs apresentaram um custo final baixo (Tabela 22), considerando todas as suas funcionalidades. Além disso, o transporte das soluções ao longo dos dispositivos foi realizado sem o emprego de qualquer sistema de bombeamento mecânico, explorando apenas a ação capilar e gravitacional, sendo obtidos fluxos extremamente estáveis, com vazões adequadas para a realização das análises em microfluxo e com uma pequena geração de resíduos.

Tabela 22. Custo final dos dispositivos microfluídicos com base nos valores dos materiais empregados na construção.

Dispositivo	Custo final (reais)
μ TED-1	1,92
μ TED-2	2,53
μ TED-3	2,55
μ TED-4	4,37
μ TED-5	159,24

FONTE: O autor (2018).

Os dispositivos microfluídicos construídos apresentaram também uma grande simplicidade em seu funcionamento, exigindo apenas a adição do eletrólito de suporte no reservatório de entrada e a injeção da amostra diretamente no canal microfluídico, com a detecção sendo realizada por técnicas eletroquímicas simples, como a MPA ou a cronoamperometria. Os μ TEDs construídos foram caracterizados por uma grande versatilidade em suas configurações, possibilitando a integração aos dispositivos de 4 tipos de eletrodos diferentes (eletrodos de grafite, biossensor de PTB-GOx, eletrodos de Au e eletrodo de carbono impresso), os quais foram utilizados na determinação de 9 analitos diferentes (fármacos e biomarcadores corporais), através de análises em microfluxo com detecção individual de NPX, glicose, HCZ e UA, ou análises da mistura dos analitos (ACT + DCF, AA + DA e AA + EP) baseadas na separação eletroquímica por MPA ou por separações cromatográficas através do mecanismo de troca iônica nos fios de algodão do próprio canal microfluídico dos dispositivos.

Além disso, os μ TEDs apresentaram bons desempenhos analíticos, com uma grande estabilidade nas suas respostas eletroquímicas, com variações de no máximo 6,55% e 8,55% para injeções consecutivas dos analitos (estudos de repetibilidade) ou para diferentes dispositivos construídos (estudos de reprodutibilidade), respectivamente. Boas frequências analíticas também foram obtidas com os μ TEDs, com valores entre 45 e 208 injeções por hora para as medidas por μ FIA e de 4 injeções por hora para as análises contendo separações cromatográficas, além de amplas faixas lineares (abrangendo concentração entre $\mu\text{mol L}^{-1}$ e mmol L^{-1}) e LDs na ordem de $\mu\text{mol L}^{-1}$ para os analitos avaliados. Com isso, foi possível a aplicação dos dispositivos para a realização de análises em amostras reais, com a determinação de NPX em formulações farmacêuticas, além de glicose, AA e DA em lágrimas, com a obtenção de altos valores de recuperação e boas correlações com as concentrações dos analitos relatados na literatura.

Portanto, a construção dos μ TEDs através da integração dos fios de algodão com as técnicas eletroquímicas, permitiram o desenvolvimento de dispositivos microfluídicos simples, baratos, versáteis, com alta portabilidade, boas respostas analíticas e baixa geração de resíduos, apresentando-se como uma alternativa acessível e eficiente para a realização de ensaios eletroanalíticos miniaturizados.

Por fim, com a alta versatilidade dos μ TEDs, muitas outras possibilidades analíticas ainda pode ser exploradas, tais como a incorporação de diferentes grupamentos funcionais através de tratamentos diversos e/ou imobilização de elementos de reconhecimento biológico (enzimas, proteínas, anticorpos, ácido nucleicos, células, entre outros) diretamente nos fios de algodão para a determinação seletiva de biomarcadores em amostras reais complexas. Também podem ser construídos misturadores e separadores de soluções e amostras através da utilização de canais interligados por nós. Além disso, os dispositivos desenvolvidos (especialmente o μ TED-5) permitem a realização de análises portáteis, característica que pode ser explorada e aprimorada para a realização de medidas *in situ* com transmissão em tempo real dos dados das análises.

REFERÊNCIAS

1. COLTRO, W. K. P., E.; CARRILHO, E.; JESUS, D. P.; SILVA, J. A. F.; SILVA, H. D. T.; LAGO, C. L. Microsistemas de análises químicas. Introdução, tecnologias de fabricação, instrumentação e aplicações. **Química Nova**, v. 30, p. 1986-2000, 2007.
2. MARLE, L.; GREENWAY, G. M. Microfluidic devices for environmental monitoring. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 24, n. 9, p. 795-802, 2005.
3. PRASERTBOONYAI, K.; ARQUEROPANYO, O. A.; LIAWRAUNGRATH, B.; LIAWRAUNGRATH, S.; POJANAKAROON, T. Miniaturization of spectrophotometry based on micro flow analysis using norfloxacin as less-toxic reagent for iron determination. **Spectrochimica Acta. Part A, Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 151, p. 532-537, 2015.
4. TOBISZEWSKI, M. Metrics for green analytical chemistry. **Analytical Methods**, v. 8, n. 15, p. 2993-2999, 2016.
5. WANG, X.; BHADRA, C. M.; YEN DANG, T. H.; BUVIDAS, R.; WANG, J.; CRAWFORD, R. J.; IVANOVA, E. P.; JUODKAZIS, S. A bactericidal microfluidic device constructed using nano-textured black silicon. **RSC Advances**, v. 6, n. 31, p. 26300-26306, 2016.
6. SUGIOKA, K.; XU, J.; WU, D.; HANADA, Y.; WANG, Z.; CHENG, Y.; MIDORIKAWA, K. Femtosecond laser 3D micromachining: a powerful tool for the fabrication of microfluidic, optofluidic, and electrofluidic devices based on glass. **Lab on a Chip**, v. 14, n. 18, p. 3447-3458, 2014.
7. KUNSTMANN-OLSEN, C.; HANCZYC, M. M.; HOYLAND, J.; RASMUSSEN, S.; RUBAHN, H.-G. Uniform droplet splitting and detection using Lab-on-Chip flow cytometry on a microfluidic PDMS device. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 229, p. 7-13, 2016.
8. WU, N. Z., Y.; BROWN, S.; OAKESHOTT, J.; PEAT, T. S.; SURJADI, R.; EASTON, C.; LEECH, P. W.; SEXTON, B. A. A PMMA microfluidic droplet platform for in vitro protein expression using crude E. coli S30 extract. **Lab on a Chip**, v. 9, p. 3391-3398, 2009.
9. OGONCZYK, D.; WEGRZYN, J.; JANKOWSKI, P.; DABROWSKI, B.; GARSTECKI, P. Bonding of microfluidic devices fabricated in polycarbonate. **Lab on a Chip**, v. 10, n. 10, p. 1324-1327, 2010.
10. YOUNG, E. W.; BERTHIER, E.; GUCKENBERGER, D. J.; SACKMANN, E.; LAMERS, C.; MEYVANTSSON, I.; HUTTENLOCHER, A.; BEEBE, D. J. Rapid prototyping of arrayed microfluidic systems in polystyrene for cell-based assays. **Analytical chemistry**, v. 83, n. 4, p. 1408-1417, 2011.
11. MONOŠÍK, R.; ANGNES, L. Utilisation of micro- and nanoscaled materials in microfluidic analytical devices. **Microchemical Journal**, v. 119, p. 159-168, 2015.
12. RAPP, B. E.; CARNEIRO, L.; LANGE, K.; RAPP, M. An indirect microfluidic flow injection analysis (FIA) system allowing diffusion free pumping of liquids by using tetradecane as intermediary liquid. **Lab on a Chip**, v. 9, n. 2, p. 354-356, 2009.
13. XU, L.; LEE, H.; JETTA, D.; OH, K. W. Vacuum-driven power-free microfluidics utilizing the gas solubility or permeability of polydimethylsiloxane (PDMS). **Lab on a Chip**, v. 15, n. 20, p. 3962-3979, 2015.

14. JIA, X.; SONG, T.; LIU, Y.; MENG, L.; MAO, X. An immunochromatographic assay for carcinoembryonic antigen on cotton thread using a composite of carbon nanotubes and gold nanoparticles as reporters. **Analytica Chimica Acta**, v. 969, p. 57-62, 2017.
15. MOSTAFALU, P.; AKBARI, M.; ALBERTI, K. A.; XU, Q.; KHADEMOSSEINI, A.; SONKUSALE, S. R. A toolkit of thread-based microfluidics, sensors and electronics for 3D tissue embedding for medical diagnostics. **Microsystems & Nanoengineering**, v. 2, n. 1, p. 16039-1-16039-10, 2016.
16. KOUTILELLIS, G. D.; ECONOMOU, A.; EFSTATHIOU, C. E. A potentiostat featuring an integrator transimpedance amplifier for the measurement of very low currents--Proof-of-principle application in microfluidic separations and voltammetry. **The Review of Scientific Instruments**, v. 87, n. 3, p. 034101-1-034101-9, 2016.
17. BANSOD, B.; KUMAR, T.; THAKUR, R.; RANA, S.; SINGH, I. A review on various electrochemical techniques for heavy metal ions detection with different sensing platforms. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 94, p. 443-455, 2017.
18. WHITESIDES, G. M. The origins and the future of microfluidics. **Nature**, v. 442, n. 7101, p. 368-373, 2006.
19. LE, H. P. Progress and Trends in Ink-jet Printing Technology. **Journal of Imaging Science and Technology**, v. 42, p. 49-62, 1998.
20. TERRY, S. C. J., J. H.; ANGELL, J. B. A Gas Chromatographic Air Analyzer Fabricated on a Silicon Wafer. **IEEE Transactions on Electron Device**, v. 26, p. 1880-1886, 1979.
21. MARK, D.; HAEBERLE, S.; ROTH, G.; VON STETTEN, F.; ZENGERLE, R. Microfluidic lab-on-a-chip platforms: requirements, characteristics and applications. **Chemical Society reviews**, v. 39, n. 3, p. 1153-1182, 2010.
22. MANZ, A. M., Y. M.; WATANABE, Y.; MIYAGI, H.; SATO, K. Desing of an Open-tubular Column Liquid Chromatograph Using Silicon Chip Technology. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 1, p. 249-255, 1990.
23. BARTOS, H.; GOETZ, F.; PETERS, R. Microfluidics Meets Nano: Lab-on-a-Chip Devices and their Potential for Nanobiotechnology. In NIEMEYER, C. M.; MIRKIN, C. A. (Ed.) **Nanobiotechnology: Concepts, Applications and Perspectives**. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH, 2004.
24. REYES, D. R.; IOSSIFIDIS, D.; AUROUX, P. A.; MANZ, A. Micro Total Analysis Systems. 1. Introduction, Theory, and Technology. **Analitycal Chemistry**, v. 74, p. 2623-2636, 2002.
25. RIOS, A.; ZOUGAGH, M.; AVILA, M. Miniaturization through lab-on-a-chip: utopia or reality for routine laboratories? A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 740, p. 1-11, 2012.
26. HAEBERLE, S.; ZENGERLE, R. Microfluidic platforms for lab-on-a-chip applications. **Lab on a Chip**, v. 7, n. 9, p. 1094-1110, 2007.
27. BOYD-MOSS, M.; BARATCHI, S.; DI VENERE, M.; KHOSHMANESH, K. Self-contained microfluidic systems: a review. **Lab on a Chip**, v. 16, n. 17, p. 3177-3192, 2016.
28. LEI, K. F. Microfluidic systems for diagnostic applications: a review. **Journal of Laboratory Automation**, v. 17, n. 5, p. 330-347, 2012.

29. NAHAVANDI, S.; BARATCHI, S.; SOFFE, R.; TANG, S. Y.; NAHAVANDI, S.; MITCHELL, A.; KHOSHMANESH, K. Microfluidic platforms for biomarker analysis. **Lab on a Chip**, v. 14, n. 9, p. 1496-1514, 2014.
30. TRIETSCH, S. J.; HANKEMEIER, T.; VAN DER LINDEN, H. J. Lab-on-a-chip technologies for massive parallel data generation in the life sciences: A review. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 108, n. 1, p. 64-75, 2011.
31. LISOWSKI, P.; ZARZYCKI, P. K. Microfluidic Paper-Based Analytical Devices (μ PADs) and Micro Total Analysis Systems (μ TAS): Development, Applications and Future Trends. **Chromatographia**, v. 76, p. 1201-1214, 2013.
32. DOU, Y.; WANG, B.; JIN, M.; YU, Y.; ZHOU, G.; SHUI, L. A review on self-assembly in microfluidic devices. **Journal of Micromechanics and Microengineering**, v. 27, n. 11, p. 113002-1-113002-13, 2017.
33. SQUIRES, T. M.; QUAKE, S. R. Microfluidics: Fluid physics at the nanoliter scale. **Reviews of Modern Physics**, v. 77, p. 977-1026, 2005.
34. ATENCIA, J.; BEEBE, D. J. Controlled microfluidic interfaces. **Nature**, v. 437, n. 7059, p. 648-655, 2005.
35. VAN DINTHER, A. M.; SCHROEN, C. G.; VERGELDT, F. J.; VAN DER SMAN, R. G.; BOOM, R. M. Suspension flow in microfluidic devices--a review of experimental techniques focussing on concentration and velocity gradients. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 173, p. 23-34, 2012.
36. RIOS, A. ESCARPA, A.; SIMONET, B. **Miniaturization of Analytical Systems: Principles, Designs and Applications**. Chichester: John Wiley & Sons, 2009.
37. SONKER, M.; SAHORE, V.; WOOLLEY, A. T. Recent advances in microfluidic sample preparation and separation techniques for molecular biomarker analysis: A critical review. **Analytica Chimica Acta**, v. 986, p. 1-11, 2017.
38. DATE, Y.; AOTA, A.; TERAOKA, S.; SASAKI, K.; MATSUMOTO, N.; WATANABE, Y.; MATSUE, T.; OHMURA, N. Trace-level mercury ion (Hg^{2+}) analysis in aqueous sample based on solid-phase extraction followed by microfluidic immunoassay. **Analytical Chemistry**, v. 85, n. 1, p. 434-440, 2013.
39. NGE, P. N.; PAGADUAN, J. V.; YU, M.; WOOLLEY, A. T. Microfluidic chips with reversed-phase monoliths for solid phase extraction and on-chip labeling. **Journal of Chromatography A**, v. 1261, p. 129-135, 2012.
40. NGUYEN, T.; PEI, R.; STOJANOVIC, M.; LIN, Q. An aptamer-based microfluidic device for thermally controlled affinity extraction. **Microfluidics and Nanofluidics**, v. 6, n. 4, p. 479-487, 2008.
41. GIORDANO, B. C.; BURGI, D. S.; HART, S. J.; TERRAY, A. On-line sample pre-concentration in microfluidic devices: a review. **Analytica Chimica Acta**, v. 718, p. 11-24, 2012.
42. WU, J.; FERRANCE, J. P.; LANDERS, J. P.; WEBER, S. G. Integration of a Precolumn Fluorogenic Reaction, Separation, and Detection of Reduced Glutathione. **Analytical Chemistry**, v. 82, p. 7267-7273, 2010.

43. BREADMORE, M. C. Capillary and microchip electrophoresis: challenging the common conceptions. **Journal of Chromatography A**, v. 1221, p. 42-55, 2012.
44. FANG, Z. L.; FANG, Q. Development of a low-cost microfluidic capillary-electrophoresis system coupled with flow-injection and sequential-injection sample introduction (review). **Fresenius' Journal of Analytical Chemistry**, v. 370, p. 978-983, 2001.
45. KOCZKA, P. I.; GASPAR, A. Application of a capillary-assembled microfluidic system for separation of cephalosporins. **Electrophoresis**, v. 35, n. 17, p. 2534-2537, 2014.
46. GUTZWEILER, L.; GLEICHMANN, T.; TANGUY, L.; KOLTAY, P.; ZENGERLE, R.; RIEGGER, L. Open microfluidic gel electrophoresis: Rapid and low cost separation and analysis of DNA at the nanoliter scale. **Electrophoresis**, v. 38, n. 13-14, p. 1764-1770, 2017.
47. DAS, C.; FAN, Z. H. Effects of separation length and voltage on isoelectric focusing in a plastic microfluidic device. **Electrophoresis**, v. 27, n. 18, p. 3619-3626, 2006.
48. KUTTER, J. P. Liquid phase chromatography on microchips. **Journal of Chromatography A**, v. 1221, p. 72-82, 2012.
49. LAVRIK, N. V.; TAYLOR, L. T.; SEPANIAK, M. J. Nanotechnology and chip level systems for pressure driven liquid chromatography and emerging analytical separation techniques: a review. **Analytica Chimica Acta**, v. 694, n. 1-2, p. 6-20, 2011.
50. PRUIM, P.; SCHOENMAKERS, P. J.; KOK, W. T. Microfluidic Pressure Driven Liquid Chromatography of Biologically Relevant Samples. **Chromatographia**, v. 75, n. 21-22, p. 1225-1234, 2012.
51. QU, P.; LEI, J.; SHENG, J.; ZHANG, L.; JU, H. Simultaneous multiple enantioseparation with a one-pot imprinted microfluidic channel by microchip capillary electrochromatography. **The Analyst**, v. 136, n. 5, p. 920-926, 2011.
52. JANG, L. W.; RAZU, M. E.; JENSEN, E. C.; JIAO, H.; KIM, J. A fully automated microfluidic micellar electrokinetic chromatography analyzer for organic compound detection. **Lab on a Chip**, v. 16, n. 18, p. 3558-3564, 2016.
53. MAI, J.; SOMMER, G. J.; HATCH, A. V. Microfluidic digital isoelectric fractionation for rapid multidimensional glycoprotein analysis. **Analytical Chemistry**, v. 84, n. 8, p. 3538-3545, 2012.
54. SHENDRUK, T. N.; TAHVILDARI, R.; CATAFARD, N. M.; ANDRZEJEWSKI, L.; GIGAULT, C.; TODD, A.; GAGNE-DUMAIS, L.; SLATER, G. W.; GODIN, M. Field-flow fractionation and hydrodynamic chromatography on a microfluidic chip. **Analytical Chemistry**, v. 85, n. 12, p. 5981-5988, 2013.
55. NISAR, A.; AFZULPURKAR, N.; MAHAISAVARIYA, B.; TUANTRANONT, A. MEMS-based micropumps in drug delivery and biomedical applications. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 130, n. 2, p. 917-942, 2008.
56. ABHARI, F.; JAAFAR, H.; YUNUS, N. A. M. A Comprehensive Study of Micropumps Technologies. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 7, p. 9765-9780, 2012.
57. SAFAVIEH, R.; TAMAYOL, A.; JUNCKER, D. Serpentine and leading-edge capillary pumps for microfluidic capillary systems. **Microfluidics and Nanofluidics**, v. 18, n. 3, p. 357-366, 2014.

58. SONGOK, J.; TOIVAKKA, M. Modelling of capillary-driven flow for closed paper-based microfluidic channels. **Journal of Micromechanics and Microengineering**, v. 27, n. 6, p. 065001, 2017.
59. DE GROOT, T. E.; VESERAT, K. S.; BERTHIER, E.; BEEBE, D. J.; THEBERGE, A. B. Surface-tension driven open microfluidic platform for hanging droplet culture. **Lab on a Chip**, v. 16, n. 2, p. 334-344, 2016.
60. DU, W. B.; FANG, Q.; HE, Q. H.; FANG, Z. L. High-Throughput Nanoliter Sample Introduction Microfluidic Chip-Based Flow Injection Analysis System with Gravity-Driven Flows. **Analytical Chemistry**, v. 77, p. 1330-1337, 2005.
61. LIANG, D. Y.; TENTORI, A. M.; DIMOV, I. K.; LEE, L. P. Systematic characterization of degas-driven flow for poly(dimethylsiloxane) microfluidic devices. **Biomicrofluidics**, v. 5, n. 2, p. 024108-1-024108-16, 2011.
62. HE, C.; LU, J. J.; JIA, Z.; WANG, W.; WANG, X.; DASGUPTA, P. K.; LIU, S. Flow batteries for microfluidic networks: configuring an electroosmotic pump for nonterminal positions. **Analytical Chemistry**, v. 83, n. 7, p. 2430-2433, 2011.
63. XIANG, J.; CAI, Z.; ZHANG, Y.; WANG, W. A micro-cam actuated linear peristaltic pump for microfluidic applications. **Sensors and Actuators A: Physical**, v. 251, p. 20-25, 2016.
64. ARIFIN, D. R.; YEO, L. Y.; FRIEND, J. R. Microfluidic blood plasma separation via bulk electrohydrodynamic flows. **Biomicrofluidics**, v. 1, n. 1, p. 14103, 2007.
65. LENSCHOF, A.; EVANDER, M.; LAURELL, T.; NILSSON, J. Acoustofluidics 5: Building microfluidic acoustic resonators. **Lab on a Chip**, v. 12, n. 4, p. 684-695, 2012.
66. ORTIZ-PÉREZ, A. S.; GARCÍA-ÁNGEL, V.; ACUÑA-RAMÍREZ, A.; VARGAS-OSUNA, L. E.; PÉREZ-BARRERA, J.; CUEVAS, S. Magnetohydrodynamic flow with slippage in an annular duct for microfluidic applications. **Microfluidics and Nanofluidics**, v. 21, n. 8, p. 1-19, 2017.
67. ZHANG, C.; XING, D.; LI, Y. Micropumps, microvalves, and micromixers within PCR microfluidic chips: Advances and trends. **Biotechnology Advances**, v. 25, n. 5, p. 483-514, 2007.
68. BALL, C. S.; RENZI, R. F.; PRIYE, A.; MEAGHER, R. J. A simple check valve for microfluidic point of care diagnostics. **Lab on a Chip**, v. 16, n. 22, p. 4436-4444, 2016.
69. VIG, A. L.; HALDRUP, K.; ENEVOLDSEN, N.; THILSTED, A. H.; ERIKSEN, J.; KRISTENSEN, A.; FEIDENHANS'L, R.; NIELSEN, M. M. Windowless microfluidic platform based on capillary burst valves for high intensity x-ray measurements. **The Review of Scientific Instruments**, v. 80, n. 11, p. 115114-1-115114-6, 2009.
70. NAM, S. W.; VAN NOORT, D.; YANG, Y.; PARK, S. A biological sensor platform using a pneumatic-valve controlled microfluidic device containing *Tetrahymena pyriformis*. **Lab on a Chip**, v. 7, n. 5, p. 638-640, 2007.
71. GUI, L.; YU, B. Y.; REN, C. L.; HUISOON, J. P. Microfluidic phase change valve with a two-level cooling/heating system. **Microfluidics and Nanofluidics**, v. 10, n. 2, p. 435-445, 2010.

72. BRUNET, A. R.; LABELLE, F.; WONG, P.; GERVAIS, T. Reconfigurable Microfluidic Magnetic Valve Arrays: Towards a Radiotherapy-Compatible Spheroid Culture Platform for the Combinatorial Screening of Cancer Therapies. **Sensors**, v. 17, n. 10, p. 1-11, 2017.
73. LEE, C.-Y.; WANG, W.-T.; LIU, C.-C.; FU, L.-M. Passive mixers in microfluidic systems: A review. **Chemical Engineering Journal**, v. 288, p. 146-160, 2016.
74. LEE, C. Y.; CHANG, C. L.; WANG, Y. N.; FU, L. M. Microfluidic mixing: a review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, n. 5, p. 3263-3287, 2011.
75. SEIA, M. A.; PEREIRA, S. V.; FONTÁN, C. A.; DE VITO, I. E.; MESSINA, G. A.; RABA, J. Laser-induced fluorescence integrated in a microfluidic immunosensor for quantification of human serum IgG antibodies to *Helicobacter pylori*. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 168, p. 297-302, 2012.
76. ALAHMAD, W.; URAISIN, K.; NACAPRICHA, D.; KANETA, T. A miniaturized chemiluminescence detection system for a microfluidic paper-based analytical device and its application to the determination of chromium(iii). **Analytical Methods**, v. 8, n. 27, p. 5414-5420, 2016.
77. KADIMISSETTY, K.; MALLA, S.; SARDESAI, N. P.; JOSHI, A. A.; FARIA, R. C.; LEE, N. H.; RUSLING, J. F. Automated Multiplexed ECL Immunoarrays for Cancer Biomarker Proteins. **Analytical Chemistry**, v. 87, n. 8, p. 4472-4478, 2015.
78. DING, J.; HE, N.; LISAK, G.; QIN, W.; BOBACKA, J. Paper-based microfluidic sampling and separation of analytes for potentiometric ion sensing. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 243, p. 346-352, 2017.
79. DUARTE, L. C.; CHAGAS, C. L. S.; RIBEIRO, L. E. B.; COLTRO, W. K. T. 3D printing of microfluidic devices with embedded sensing electrodes for generating and measuring the size of microdroplets based on contactless conductivity detection. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 251, p. 427-432, 2017.
80. AKHTAR, M. H.; HUSSAIN, K. K.; GURUDATT, N. G.; SHIM, Y. B. Detection of Ca(2+)-induced acetylcholine released from leukemic T-cells using an amperometric microfluidic sensor. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 98, p. 364-370, 2017.
81. HUANG, C. M.; ZHU, Y.; JIN, D. Q.; KELLY, R. T.; FANG, Q. Direct Surface and Droplet Microsampling for Electrospray Ionization Mass Spectrometry Analysis with an Integrated Dual-Probe Microfluidic Chip. **Analytical Chemistry**, v. 89, n. 17, p. 9009-9016, 2017.
82. YANG, M.; CHAO, T. C.; NELSON, R.; ROS, A. Direct detection of peptides and proteins on a microfluidic platform with MALDI mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 404, n. 6-7, p. 1681-1689, 2012.
83. FU, C.; WANG, Y.; CHEN, G.; YANG, L.; XU, S.; XU, W. Aptamer-based surface-enhanced Raman scattering-microfluidic sensor for sensitive and selective polychlorinated biphenyls detection. **Analytical Chemistry**, v. 87, n. 19, p. 9555-9558, 2015.
84. HUANG, C.; BONROY, K.; REEKMANS, G.; LAUREYN, W.; VERHAEGEN, K.; DE VLAMINCK, I.; LAGAE, L.; BORGHS, G. Localized surface plasmon resonance biosensor integrated with microfluidic chip. **Biomedical Microdevices**, v. 11, n. 4, p. 893-901, 2009.
85. THIES, J. W.; KUHN, P.; THÜRMANN, B.; DÜBEL, S.; DIETZEL, A. Microfluidic quartz-crystal-microbalance (QCM) sensors with specialized immunoassays for extended

measurement range and improved reusability. **Microelectronic Engineering**, v. 179, p. 25-30, 2017.

86. CHANDRA, P.; ZAIDI, S. A.; NOH, H. B.; SHIM, Y. B. Separation and simultaneous detection of anticancer drugs in a microfluidic device with an amperometric biosensor. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 28, n. 1, p. 326-332, 2011.

87. KOPPARTHY, V. L.; TANGUTOORU, S. M.; GUILBEAU, E. J. Label Free Detection of L-Glutamate Using Microfluidic Based Thermal Biosensor. **Bioengineering**, v. 2, n. 1, p. 2-14, 2015.

88. NGE, P. N.; ROGERS, C. I.; WOOLLEY, A. T. Advances in microfluidic materials, functions, integration, and applications. **Chemical Reviews**, v. 113, n. 4, p. 2550-2583, 2013.

89. KOVARIK, M. L.; ORNOFF, D. M.; MELVIN, A. T.; DOBES, N. C.; WANG, Y.; DICKINSON, A. J.; GACH, P. C.; SHAH, P. K.; ALLBRITTON, N. L. Micro total analysis systems: fundamental advances and applications in the laboratory, clinic, and field. **Analytical Chemistry**, v. 85, n. 2, p. 451-472, 2013.

90. PATABADIGE, D. E.; JIA, S.; SIBBITTS, J.; SADEGHI, J.; SELLENS, K.; CULBERTSON, C. T. Micro Total Analysis Systems: Fundamental Advances and Applications. **Analytical Chemistry**, v. 88, n. 1, p. 320-338, 2016.

91. CULBERTSON, C. T.; MICKLEBURGH, T. G.; STEWART-JAMES, S. A.; SELLENS, K. A.; PRESSNALL, M. Micro total analysis systems: fundamental advances and biological applications. **Analytical Chemistry**, v. 86, n. 1, p. 95-118, 2014.

92. LUKA, G.; AHMADI, A.; NAJJARAN, H.; ALOCILJA, E.; DEROSA, M.; WOLTERS, K.; MALKI, A.; AZIZ, H.; ALTHANI, A.; HOORFAR, M. Microfluidics Integrated Biosensors: A Leading Technology towards Lab-on-a-Chip and Sensing Applications. **Sensors**, v. 15, n. 12, p. 30011-30031, 2015.

93. ROY, E.; PALLANDRE, A.; ZRIBI, B.; HORNY, M.; DELAPIERRE, F. D.; CATTONI, A.; GAMBY, J.; HAGHIRI-GOSNET, A. Overview of Materials for Microfluidic Applications. In: YU, X. Y. (Ed.). **Advances in Microfluidics - New Applications in Biology, Energy, and Materials Sciences**. Rijeka: InTech, 2016. p. 335-355.

94. ILIESCU, C.; TAYLOR, H.; AVRAM, M.; MIAO, J.; FRANSSILA, S. A practical guide for the fabrication of microfluidic devices using glass and silicon. **Biomicrofluidics**, v. 6, n. 1, p. 016505-1-016505-16, 2012.

95. MELLORS, J. S.; GORBOUNOV, V.; RAMSEY, R. S.; RAMSEY, J. M. Fully Integrated Glass Microfluidic Device for Performing High-Efficiency Capillary Electrophoresis and Electrospray Ionization Mass Spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 80, p. 6881-6887, 2008.

96. ZEIBI SHIREJINI, S.; MOHAMMADI, A. Halogen–Lithium Exchange Reaction Using an Integrated Glass Microfluidic Device: An Optimized Synthetic Approach. **Organic Process Research & Development**, v. 21, n. 3, p. 292-303, 2017.

97. SAHIN, S.; BLIZNYUK, O.; ROVALINO CORDOVA, A.; SCHROEN, K. Microfluidic EDGE emulsification: the importance of interface interactions on droplet formation and pressure stability. **Scientific Reports**, v. 6, p. 26407-1-26407-7, 2016.

98. TOKESHI, M.; MINAGAWA, T.; KITAMORI, T. Integration of a Microextraction System on a Glass Chip: Ion-Pair Solvent Extraction of Fe(II) with 4,7-Diphenyl-1,10-phenanthrolinedisulfonic Acid and Tri-n-octylmethylammonium Chloride. **Analytical Chemistry**, v. 72, p. 1711-1714, 2000.
99. REN, K.; ZHOU, J.; WU, H. Materials for Microfluidic Chip Fabrication. **Accounts of Chemical Research**, v. 46, p. 2396-2406, 2013.
100. ALRIFAIY, A.; LINDAHL, O. A.; RAMSER, K. Polymer-Based Microfluidic Devices for Pharmacy, Biology and Tissue Engineering. **Polymers**, v. 4, n. 4, p. 1349-1398, 2012.
101. TSAO, C.-W. Polymer Microfluidics: Simple, Low-Cost Fabrication Process Bridging Academic Lab Research to Commercialized Production. **Micromachines**, v. 7, n. 12, p. 225-1-225-11, 2016.
102. BECKER, H.; GARTNER, C. Polymer microfabrication technologies for microfluidic systems. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 390, n. 1, p. 89-111, 2008.
103. FRIEND, J.; YEO, L. Fabrication of microfluidic devices using polydimethylsiloxane. **Biomicrofluidics**, v. 4, n. 2, p. 026502-1-026502-5, 2010.
104. HWANG, Y.; CANDLER, R. N. Non-planar PDMS microfluidic channels and actuators: a review. **Lab on a Chip**, v. 17, n. 23, p. 3948-3959, 2017.
105. RODRIGUEZ-RUIZ, I.; BABENKO, V.; MARTINEZ-RODRIGUEZ, S.; GAVIRA, J. A. Protein separation under a microfluidic regime. **The Analyst**, v. 143, n. 3, p. 606-619, 2018.
106. TEMIZ, Y.; LOVCHIK, R. D.; KAIGALA, G. V.; DELAMARCHE, E. Lab-on-a-chip devices: How to close and plug the lab? **Microelectronic Engineering**, v. 132, p. 156-175, 2015.
107. MOSCHOU, D.; TSEREPI, A. The lab-on-PCB approach: tackling the muTAS commercial upscaling bottleneck. **Lab on a Chip**, v. 17, n. 8, p. 1388-1405, 2017.
108. TSAO, C.-W.; DEVUE, D. L. Bonding of thermoplastic polymer microfluidics. **Microfluidics and Nanofluidics**, v. 6, n. 1, p. 1-16, 2008.
109. MOU, L.; JIANG, X. Materials for Microfluidic Immunoassays: A Review. **Advanced Healthcare Materials**, v. 6, n. 15, p. 1601403-1-1601403-20, 2017.
110. MARTINEZ, A. W.; PHILLIPS, S. T.; BUTTE, M. J.; WHITESIDES, G. M. Patterned paper as a platform for inexpensive, low-volume, portable bioassays. **Angewandte Chemie**, v. 46, n. 8, p. 1318-1320, 2007.
111. MORBIOLI, G. G.; MAZZU-NASCIMENTO, T.; STOCKTON, A. M.; CARRILHO, E. Technical aspects and challenges of colorimetric detection with microfluidic paper-based analytical devices (muPADs) - A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 970, p. 1-22, 2017.
112. YAMADA, K.; SHIBATA, H.; SUZUKI, K.; CITTERIO, D. Toward practical application of paper-based microfluidics for medical diagnostics: state-of-the-art and challenges. **Lab on a Chip**, v. 17, n. 7, p. 1206-1249, 2017.
113. YETISEN, A. K.; AKRAM, M. S.; LOWE, C. R. Paper-based microfluidic point-of-care diagnostic devices. **Lab on a Chip**, v. 13, n. 12, p. 2210-2251, 2013.
114. SRIRAM, G.; BHAT, M. P.; PATIL, P.; UTHAPPA, U. T.; JUNG, H.-Y.; ALTALHI, T.; KUMERIA, T.; AMINABHAVI, T. M.; PAI, R. K.; MADHUPRASAD; KURKURI, M. D. Paper-based microfluidic

analytical devices for colorimetric detection of toxic ions: A review. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 93, p. 212-227, 2017.

115. HE, Y.; WU, Y.; FU, J.-Z.; WU, W.-B. Fabrication of paper-based microfluidic analysis devices: a review. **RSC Advances**, v. 5, n. 95, p. 78109-78127, 2015.

116. CATE, D. M.; ADKINS, J. A.; METTAKOONPITAK, J.; HENRY, C. S. Recent developments in paper-based microfluidic devices. **Analytical Chemistry**, v. 87, n. 1, p. 19-41, 2015.

117. XIA, Y.; SI, J.; LI, Z. Fabrication techniques for microfluidic paper-based analytical devices and their applications for biological testing: A review. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 77, p. 774-789, 2016.

118. YANG, Y.; NOVIANA, E.; NGUYEN, M. P.; GEISS, B. J.; DANDY, D. S.; HENRY, C. S. Paper-Based Microfluidic Devices: Emerging Themes and Applications. **Analytical Chemistry**, v. 89, n. 1, p. 71-91, 2017.

119. AKYAZI, T.; BASABE-DESMONTS, L.; BENITO-LOPEZ, F. Review on microfluidic paper-based analytical devices towards commercialisation. **Analytica Chimica Acta**, v. 1001, p. 1-17, 2018.

120. BALLERINI, D. R.; LI, X.; SHEN, W. Patterned paper and alternative materials as substrates for low-cost microfluidic diagnostics. **Microfluidics and Nanofluidics**, v. 13, n. 5, p. 769-787, 2012.

121. LIU, R.; LIU, C.; LI, H.; LIU, M.; WANG, D.; ZHANG, C. Bipolar electrochemiluminescence on thread: A new class of electroanalytical sensors. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 94, p. 335-343, 2017.

122. WAKELYN, P. J.; BERTONIERE, N. R.; FRENCH, A. D.; THIBODEAUX, D. P.; TRIPLETT, B. A.; ROUSSELLE, M.; GOYNES JR, W. R.; EDWARDS, J. V.; HUNTER, L.; MCALISTER, D. D.; GAMBLE, G. R. **Cotton Fiber Chemistry and Technology**. Boca Raton: CRC Press, 2006.

123. KIM, J. T.; NETRAVALI, A. N. Mercerization of sisal fibers: Effect of tension on mechanical properties of sisal fiber and fiber-reinforced composites. **Composites Part A: Applied Science and Manufacturing**, v. 41, n. 9, p. 1245-1252, 2010.

124. GUO, C.; LI, T.; WANG, C.; WANG, Y.; ZHANG, Y. Enzymatic treatment on cotton fibers: degradation kinetics of pectin and influence of shape change on adsorption. **Fibers and Polymers**, v. 18, n. 10, p. 1882-1890, 2017.

125. DEGANI, O.; GEPSTEIN, S.; DOSORETZ, C. G. Potential Use of Cutinase in Enzymatic Scouring of Cotton Fiber Cuticle. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 102-103, p. 277-289, 2002.

126. LI, X.; TIAN, J.; SHEN, W. Thread as a versatile material for low-cost microfluidic diagnostics. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 2, n. 1, p. 1-6, 2010.

127. NILGHAZ, A.; WICAKSONO, D. H.; GUSTIONO, D.; ABDUL MAJID, F. A.; SUPRIYANTO, E.; ABDUL KADIR, M. R. Flexible microfluidic cloth-based analytical devices using a low-cost wax patterning technique. **Lab on a Chip**, v. 12, n. 1, p. 209-218, 2012.

128. BHANDARI, P.; NARAHARI, T.; DENDUKURI, D. 'Fab-chips': a versatile, fabric-based platform for low-cost, rapid and multiplexed diagnostics. **Lab on a Chip**, v. 11, n. 15, p. 2493-2499, 2011.

129. LEE, H. V.; HAMID, S. B.; ZAIN, S. K. Conversion of lignocellulosic biomass to nanocellulose: structure and chemical process. **The Scientific World Journal**, v. 2014, p. 631013-1-631013-20, 2014.
130. SHEN, T.; GNANAKARAN, S. The stability of cellulose: a statistical perspective from a coarse-grained model of hydrogen-bond networks. **Biophysical Journal**, v. 96, n. 8, p. 3032-3040, 2009.
131. SUHAS; GUPTA, V. K.; CARROTT, P. J.; SINGH, R.; CHAUDHARY, M.; KUSHWAHA, S. Cellulose: A review as natural, modified and activated carbon adsorbent. **Bioresource Technology**, v. 216, p. 1066-1076, 2016.
132. GALLO, J. M.; ALMIRALL, J. R. Elemental analysis of white cotton fiber evidence using solution ICP-MS and laser ablation ICP-MS (LA-ICP-MS). **Forensic Science International**, v. 190, n. 1-3, p. 52-57, 2009.
133. TEODONIO, L.; MISSORI, M.; PAWCENIS, D.; LOJEWSKA, J.; VALLE, F. Nanoscale analysis of degradation processes of cellulose fibers. **Micron**, v. 91, p. 75-81, 2016.
134. YU, J. W.; CHOI, Y.-M.; KIM, S. M.; LEE, J.-K.; YOU, N.-H.; GOH, M. Synthesis of twisted ribbon-like carbon, carbon microtubes and carbon rod from mercerized cotton fiber. **Synthetic Metals**, v. 206, p. 115-119, 2015.
135. WU, T.; XU, T.; XU, L. P.; HUANG, Y.; SHI, W.; WEN, Y.; ZHANG, X. Superhydrophilic cotton thread with temperature-dependent pattern for sensitive nucleic acid detection. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 86, p. 951-957, 2016.
136. BERTHIER, J.; BRAKKE, K. A.; GOSSELIN, D.; BERTHIER, E.; NAVARRO, F. Thread-based microfluidics: Flow patterns in homogeneous and heterogeneous microfiber bundles. **Medical Engineering & Physics**, v. 48, p. 55-61, 2017.
137. CHAUDHURY, K.; KAR, S.; CHAKRABORTY, S. Diffusive dynamics on paper matrix. **Applied Physics Letters**, v. 109, n. 22, p. 224101-1-224101-5, 2016.
138. RECHES, M.; MIRICA, K. A.; DASGUPTA, R.; DICKEY, M. D.; BUTTE, M. J.; WHITESIDES, G. M. Thread as a matrix for biomedical assays. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 2, n. 6, p. 1722-1728, 2010.
139. LU, F.; MAO, Q.; WU, R.; ZHANG, S.; DU, J.; LV, J. A siphonage flow and thread-based low-cost platform enables quantitative and sensitive assays. **Lab on a Chip**, v. 15, n. 2, p. 495-503, 2015.
140. MENG, L. L.; SONG, T. T.; MAO, X. Novel immunochromatographic assay on cotton thread based on carbon nanotubes reporter probe. **Talanta**, v. 167, p. 379-384, 2017.
141. NILGHAZ, A.; BALLERINI, D. R.; SHEN, W. Exploration of microfluidic devices based on multi-filament threads and textiles: A review. **Biomicrofluidics**, v. 7, n. 5, p. 051501-1-051501-16, 2013.
142. CABOT, J. M.; BREADMORE, M. C.; PAULL, B. Thread based electrofluidic platform for direct metabolite analysis in complex samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 1000, p. 283-292, 2018.

143. MAO, X.; DU, T. E.; WANG, Y.; MENG, L. Disposable dry-reagent cotton thread-based point-of-care diagnosis devices for protein and nucleic acid test. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 65, p. 390-396, 2015.
144. GONZALEZ, A.; GAINES, M.; GOMEZ, F. A. Thread-based microfluidic chips as a platform to assess acetylcholinesterase activity. **Electrophoresis**, v. 38, n. 7, p. 996-1001, 2017.
145. ZHOU, G.; MAO, X.; JUNCKER, D. Immunochromatographic assay on thread. **Analytical Chemistry**, v. 84, n. 18, p. 7736-7743, 2012.
146. SONG, T.-T.; WANG, W.; MENG, L.-L.; LIU, Y.; JIA, X.-B.; MAO, X. Electrochemical detection of human ferritin based on gold nanorod reporter probe and cotton thread immunoassay device. **Chinese Chemical Letters**, v. 28, n. 2, p. 226-230, 2017.
147. BAGHERBAIGI, S.; CÓRCOLES, E. P.; WICAKSONO, D. H. B. Cotton fabric as an immobilization matrix for low-cost and quick colorimetric enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Analytical Methods**, v. 6, n. 18, p. 7175-7180, 2014.
148. SATEANCHOK, S.; WANGKARN, S.; SAENJUM, C.; GRUDPAN, K. A cost-effective assay for antioxidant using simple cotton thread combining paper based device with mobile phone detection. **Talanta**, v. 177, p. 171-175, 2018.
149. AVILOV, V.; ZENG, Q.; SHIPPY, S. A. Threads for tear film collection and support in quantitative amino acid analysis. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 408, n. 19, p. 5309-5317, 2016.
150. OWENS, T. L.; LEISEN, J.; BECKHAM, H. W.; BREEDVELD, V. Control of microfluidic flow in amphiphilic fabrics. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 3, n. 10, p. 3796-3803, 2011.
151. YAN, Y.; KOU, B.; YAN, L. Thread-based microfluidic three channel device in combination with thermal lens detection for the determination of copper and zinc. **Analytical Methods**, v. 7, n. 20, p. 8757-8762, 2015.
152. BALLERINI, D. R.; LI, X.; SHEN, W. Flow control concepts for thread-based microfluidic devices. **Biomicrofluidics**, v. 5, p. 014105-1-014105-13, 2011.
153. SAFAVIEH, R.; ZHOU, G. Z.; JUNCKER, D. Microfluidics made of yarns and knots: from fundamental properties to simple networks and operations. **Lab on a Chip**, v. 11, n. 15, p. 2618-2624, 2011.
154. RAMESAN, S.; REZK, A. R.; CHENG, K. W.; CHAN, P. P.; YEO, L. Y. Acoustically-driven thread-based tuneable gradient generators. **Lab on a Chip**, v. 16, n. 15, p. 2820-2828, 2016.
155. ULUM, M. F.; MAYLINA, L.; NOVIANA, D.; WICAKSONO, D. H. EDTA-treated cotton-thread microfluidic device used for one-step whole blood plasma separation and assay. **Lab on a Chip**, v. 16, n. 8, p. 1492-1504, 2016.
156. NILGHAZ, A.; ZHANG, L.; LI, M.; BALLERINI, D. R.; SHEN, W. Understanding thread properties for red blood cell antigen assays: weak ABO blood typing. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 6, n. 24, p. 22209-22215, 2014.

157. BANERJEE, S. S.; ROYCHOWDHURY, A.; TANEJA, N.; JANRAO, R.; KHANDARE, J.; PAUL, D. Chemical synthesis and sensing in inexpensive thread-based microdevices. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 186, p. 439-445, 2013.
158. NILGHAZ, A.; BALLERINI, D. R.; FANG, X.-Y.; SHEN, W. Semiquantitative analysis on microfluidic thread-based analytical devices by ruler. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 191, p. 586-594, 2014.
159. CURTO, V. F.; COYLE, S.; BYRNE, R.; ANGELOV, N.; DIAMOND, D.; BENITO-LOPEZ, F. Concept and development of an autonomous wearable micro-fluidic platform for real time pH sweat analysis. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 175, p. 263-270, 2012.
160. ERENAS, M. M.; DE ORBE-PAYA, I.; CAPITAN-VALLVEY, L. F. Surface Modified Thread-Based Microfluidic Analytical Device for Selective Potassium Analysis. **Analytical Chemistry**, v. 88, n. 10, p. 5331-5337, 2016.
161. GLAVAN, A. C.; AINLA, A.; HAMED, M. M.; FERNANDEZ-ABEDUL, M. T.; WHITESIDES, G. M. Electroanalytical devices with pins and thread. **Lab on a Chip**, v. 16, n. 1, p. 112-119, 2016.
162. TÓTH, K. S., K.; KUTNER, W.; FEHER, Z.; LINDNER, E. Electrochemical Detection in liquid flow analytical techniques: characterization and classification. **Pure and Applied Chemistry**, v. 76, p. 1119-1138, 2004.
163. ZAGATTO, E. A. G.; OLIVEIRA, C. C.; COLLINS, C. H. Classificação e definição dos métodos de análises em fluxo (Recomendações - IUPAC 1994). **Química Nova**, v. 22, p. 143-146, 1999.
164. LINDEN, W. E. Classification and definition of analytical methods based on flowing media. **Pure and Applied Chemistry**, v. 66, p. 2493-2500, 1994.
165. ARMENTA, S.; GARRIGUES, S.; DE LA GUARDIA, M. Green Analytical Chemistry. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 27, n. 6, p. 497-511, 2008.
166. TOBISZEWSKI, M.; MECHLINSKA, A.; NAMIESNIK, J. Green analytical chemistry--theory and practice. **Chemical Society Reviews**, v. 39, n. 8, p. 2869-2878, 2010.
167. GAŁUSZKA, A.; MIGASZEWSKI, Z.; NAMIEŚNIK, J. The 12 principles of green analytical chemistry and the SIGNIFICANCE mnemonic of green analytical practices. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 50, p. 78-84, 2013.
168. PENA-ABAURREA, M.; RAMOS, L. Miniaturization of Analytical Methods. In GUARDIA, M. DE LA; GARRIGUES, S. **Challenges in Green Analytical Chemistry**. Cambridge: RSC Publishing, 2011, p. 107-143.
169. TROJANOWICZ, M. Recent developments in electrochemical flow detections--a review: part I. Flow analysis and capillary electrophoresis. **Analytica Chimica Acta**, v. 653, n. 1, p. 36-58, 2009.
170. MELCHERT, W. R.; REIS, B. F.; ROCHA, F. R. Green chemistry and the evolution of flow analysis. A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 714, p. 8-19, 2012.
171. ROCHA, F. R. P.; REIS, B. F. Green Analytical Chemistry Through Flow Analysis. In GUARDIA, M. DE LA; GARRIGUES, S. **Challenges in Green Analytical Chemistry**. Cambridge: RSC Publishing, 2011, p. 144-167.

172. VAN STADEN, J. K. Application of phthalocyanines in flow- and sequential-injection analysis and microfluidics systems: A review. **Talanta**, v. 139, p. 75-88, 2015.
173. TROJANOWICZ, M.; KOLACINSKA, K. Recent advances in flow injection analysis. **The Analyst**, v. 141, n. 7, p. 2085-2139, 2016.
174. ZHU, Z.; LU, J. J.; ALMEIDA, M. I. G. S.; PU, Q.; KOLEV, S. D.; LIU, S. A microfabricated electroosmotic pump coupled to a gas-diffusion microchip for flow injection analysis of ammonia. **Microchimica Acta**, v. 182, n. 5-6, p. 1063-1070, 2014.
175. PETSUL, P. H.; GREENWAY, G. M.; HASWELL, S. J. The development of an on-chip micro-flow injection analysis of nitrate with a cadmium reductor. **Analytica Chimica Acta**, v. 428, p. 155-161, 2001.
176. DOKU, G. N.; HASWELL, S. J. Further studies into the development of a micro-FIA (μ FIA) system based on electroosmotic flow for the determination of phosphate as orthophosphate. **Analytica Chimica Acta**, v. 382, p. 1-13, 1999.
177. SATO, K.; TOKESHI, M.; KITAMORI, T.; SAWADA, T. Integration of Flow Injection Analysis and Zeptomole-Level Detection of the Fe(II)-o-Phenanthroline Complex. **Analytical Science**, v. 15, p. 641-645, 1999.
178. LV, Y.; ZHANG, Z.; CHEN, F. Chemiluminescence microfluidic system sensor on a chip for determination of glucose in human serum with immobilized reagents. **Talanta**, v. 59, p. 571-576, 2003.
179. YAKOVLEVA, J.; DAVIDSSON, R.; BENGTSSON, M.; LAURELL, T.; EMNÉUS, J. Microfluidic enzyme immunosensors with immobilised protein A and G using chemiluminescence detection. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 19, n. 1, p. 21-34, 2003.
180. ULIANA, C. V.; PEVERARI, C. R.; AFONSO, A. S.; COMINETTI, M. R.; FARIA, R. C. Fully disposable microfluidic electrochemical device for detection of estrogen receptor alpha breast cancer biomarker. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 99, p. 156-162, 2018.
181. ETTRE, L. S. Nomenclature for Chromatography. **Pure and Applied Chemistry**, v. 65, p. 819-872, 1993.
182. DATTA, S.; GHOSAL, S. Characterizing dispersion in microfluidic channels. **Lab on a Chip**, v. 9, n. 17, p. 2537-2550, 2009.
183. DESMET, G.; EELTINK, S. Fundamentals for LC miniaturization. **Analytical Chemistry**, v. 85, n. 2, p. 543-556, 2013.
184. ATURKI, Z.; ROCCO, A.; ROCCHI, S.; FANALI, S. Current applications of miniaturized chromatographic and electrophoretic techniques in drug analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 101, p. 194-220, 2014.
185. ERICKSON, D.; LI, D. Integrated microfluidic devices. **Analytica Chimica Acta**, v. 507, n. 1, p. 11-26, 2004.
186. LIOU, D.-S.; HSIEH, Y.-F.; KUO, L.-S.; YANG, C.-T.; CHEN, P.-H. Modular component design for portable microfluidic devices. **Microfluidics and Nanofluidics**, v. 10, n. 2, p. 465-474, 2010.

187. ROMAN, G. T.; KENNEDY, R. T. Fully integrated microfluidic separations systems for biochemical analysis. **Journal of Chromatography. A**, v. 1168, n. 1-2, p. 170-188; discussion 169, 2007.
188. MILED, A.; GREENER, J. Recent Advancements towards Full-System Microfluidics. **Sensors**, v. 17, n. 8, p. 1707-1-1707-7, 2017.
189. CZUGALA, M.; FAY, C.; O'CONNOR, N. E.; CORCORAN, B.; BENITO-LOPEZ, F.; DIAMOND, D. Portable integrated microfluidic analytical platform for the monitoring and detection of nitrite. **Talanta**, v. 116, p. 997-1004, 2013.
190. ROWE, A. A.; BONHAM, A. J.; WHITE, R. J.; ZIMMER, M. P.; YADGAR, R. J.; HOBZA, T. M.; HONEA, J. W.; BEN-YAACOV, I.; PLAXCO, K. W. CheapStat: an open-source, "do-it-yourself" potentiostat for analytical and educational applications. **PloS One**, v. 6, n. 9, p. e23783-1-e23783-7, 2011.
191. CRUZ, A. F.; NORENA, N.; KAUSHIK, A.; BHANSALI, S. A low-cost miniaturized potentiostat for point-of-care diagnosis. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 62, p. 249-254, 2014.
192. URBAN, P. L. Universal electronics for miniature and automated chemical assays. **The Analyst**, v. 140, n. 4, p. 963-975, 2015.
193. LIU, C.; MAUK, M. G.; HART, R.; QIU, X.; BAU, H. H. A self-heating cartridge for molecular diagnostics. **Lab on a Chip**, v. 11, n. 16, p. 2686-2692, 2011.
194. SERRANO, G.; PAUL, D.; KIM, S. J.; KURABAYASHI, K.; ZELLERS, E. T. Comprehensive two-dimensional gas chromatographic separations with a microfabricated thermal modulator. **Analytical Chemistry**, v. 84, n. 16, p. 6973-6980, 2012.
195. ESQUIVEL, J. P.; CASTELLARNAU, M.; SENN, T.; LOCHEL, B.; SAMITIER, J.; SABATE, N. Fuel cell-powered microfluidic platform for lab-on-a-chip applications. **Lab on a Chip**, v. 12, n. 1, p. 74-79, 2012.
196. THOM, N. K.; YEUNG, K.; PILLION, M. B.; PHILLIPS, S. T. "Fluidic batteries" as low-cost sources of power in paper-based microfluidic devices. **Lab on a Chip**, v. 12, n. 10, p. 1768-1770, 2012.
197. DA COSTA, E. T.; NEVES, C. A.; HOTTA, G. M.; VIDAL, D. T.; BARROS, M. F.; AYON, A. A.; GARCIA, C. D.; DO LAGO, C. L. Unmanned platform for long-range remote analysis of volatile compounds in air samples. **Electrophoresis**, v. 33, n. 17, p. 2650-2659, 2012.
198. DA ROCHA, Z. M.; MARTINEZ-CISNEROS, C. S.; SEABRA, A. C.; VALDES, F.; GONGORA-RUBIO, M. R.; ALONSO-CHAMARRO, J. Compact and autonomous multiwavelength microanalyzer for in-line and in situ colorimetric determinations. **Lab on a Chip**, v. 12, n. 1, p. 109-117, 2012.
199. YANG, K.; PERETZ-SOROKA, H.; LIU, Y.; LIN, F. Novel developments in mobile sensing based on the integration of microfluidic devices and smartphones. **Lab on a Chip**, v. 16, n. 6, p. 943-958, 2016.
200. KANCHI, S.; SABELA, M. I.; MDLULI, P. S.; INAMUDDIN; BISETTY, K. Smartphone based bioanalytical and diagnosis applications: A review. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 102, p. 136-149, 2018.

201. RODA, A.; MICHELINI, E.; ZANGHERI, M.; DI FUSCO, M.; CALABRIA, D.; SIMONI, P. Smartphone-based biosensors: A critical review and perspectives. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 79, p. 317-325, 2016.
202. RATENI, G.; DARIO, P.; CAVALLO, F. Smartphone-Based Food Diagnostic Technologies: A Review. **Sensors**, v. 17, n. 6, p. 1453-1-1453-22, 2017.
203. MARTINEZ, A. W.; PHILLIPS, S. T.; CARRILHO, E.; THOMAS, S. W.; SINDI, H.; WHITESIDES, G. M. Simple Telemedicine for Developing Regions: Camera Phones and Paper-Based Microfluidic Devices for Real-Time, Off-Site Diagnosis. **Analytical Chemistry**, v. 80, p. 3699-3707, 2008.
204. QUESADA-GONZALEZ, D.; MERKOCI, A. Mobile phone-based biosensing: An emerging "diagnostic and communication" technology. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 92, p. 549-562, 2017.
205. GAO, W.; EMAMINEJAD, S.; NYEIN, H. Y. Y.; CHALLA, S.; CHEN, K.; PECK, A.; FAHAD, H. M.; OTA, H.; SHIRAKI, H.; KIRIYA, D.; LIEN, D. H.; BROOKS, G. A.; DAVIS, R. W.; JAVEY, A. Fully integrated wearable sensor arrays for multiplexed in situ perspiration analysis. **Nature**, v. 529, n. 7587, p. 509-514, 2016.
206. LILLEHOJ, P. B.; HUANG, M. C.; TRUONG, N.; HO, C. M. Rapid electrochemical detection on a mobile phone. **Lab on a Chip**, v. 13, n. 15, p. 2950-2955, 2013.
207. KUDR, J.; ZITKA, O.; KLIMANEK, M.; VRBA, R.; ADAM, V. Microfluidic electrochemical devices for pollution analysis—A review. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 246, p. 578-590, 2017.
208. NYHOLM, L. Electrochemical techniques for lab-on-a-chip applications. **The Analyst**, v. 130, n. 5, p. 599-605, 2005.
209. XU, X.; ZHANG, S.; CHEN, H.; KONG, J. Integration of electrochemistry in micro-total analysis systems for biochemical assays: recent developments. **Talanta**, v. 80, n. 1, p. 8-18, 2009.
210. SASSA, F.; MORIMOTO, K.; SATOH, W.; SUZUKI, H. Electrochemical techniques for microfluidic applications. **Electrophoresis**, v. 29, n. 9, p. 1787-1800, 2008.
211. WINDMILLER, J. R.; SANTHOSH, P.; KATZ, E.; WANG, J. Bioelectronic system for the control and readout of enzyme logic gates. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 155, n. 1, p. 206-213, 2011.
212. ROKNSHARIFI, M.; ISLAM, S. K.; ZHU, K.; MAHBUB, I. A low power, highly stabilized three electrode potentiostat for biomedical implantable systems. **Analog Integrated Circuits and Signal Processing**, v. 83, n. 2, p. 217-229, 2015.
213. FELIX, F. S.; ANGNES, L. Fast and accurate analysis of drugs using amperometry associated with flow injection analysis. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 99, n. 12, p. 4784-4804, 2010.
214. WANG, J. **Analytical Electrochemistry**. Hoboken: John Wiley & Sons, 2006.
215. HELM, I.; JALUKSE, L.; LEITO, I. Measurement uncertainty estimation in amperometric sensors: a tutorial review. **Sensors**, v. 10, n. 5, p. 4430-4455, 2010.

216. DE OLIVEIRA, F. M.; DE J. GUEDES, T.; LIMA, A. B.; DA SILVA, L. M.; DOS SANTOS, W. T. P. Alternative method to obtain the Tafel plot for simple electrode reactions using batch injection analysis coupled with multiple-pulse amperometric detection. **Electrochimica Acta**, v. 242, p. 180-186, 2017.
217. BAVOL, D.; ECONOMOU, A.; ZIMA, J.; BAREK, J.; DEJMKOVA, H. Simultaneous determination of tert-butylhydroquinone, propyl gallate, and butylated hydroxyanisole by flow-injection analysis with multiple-pulse amperometric detection. **Talanta**, v. 178, p. 231-236, 2018.
218. SANTOS, W. T. P. dos, GIMENES, D. T.; RICHTER, E. M.; ANGNES, L. Análise por injeção em fluxo com detecção amperométrica de múltiplos pulsos: potencialidades e aplicações. **Química Nova**, v. 34, p. 1753-1761, 2011.
219. MEDEIROS, R. A.; LOURENÇÃO, B. C.; ROCHA-FILHO, R. C.; FATIBELLO-FILHO, O. Simple Flow Injection Analysis System for Simultaneous Determination of Phenolic Antioxidants with Multiple Pulse Amperometric Detection at a Boron-Doped Diamond Electrode. **Analytical Chemistry**, v. 82, p. 8658-8663, 2010.
220. TORRES PIO DOS SANTOS, W.; NASCIMENTO DE ALMEIDA, E. G.; ALVES FERREIRA, H. E.; GIMENES, D. T.; RICHTER, E. M. Simultaneous Flow Injection Analysis of Paracetamol and Ascorbic Acid with Multiple Pulse Amperometric Detection. **Electroanalysis**, v. 20, n. 17, p. 1878-1883, 2008.
221. STEFANO, J. S. L., A. P.; MONTES, R. H. O.; RICHTER, E. M.; MUÑOZ, R. A. A. Fast Determination of Naproxen in Pharmaceutical Formulations by Batch Injection Analysis with Pulsed Amperometric Detection. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, p. 1834-1838, 2012.
222. CAI, Y. E.; CAI, Y.; SHI, Y.; MOU, S.; LU, Y. Optimizing the integrated pulsed amperometric multicycle step waveform for the determination of tetracyclines. **Journal of Chromatography A**, v. 1118, n. 1, p. 35-40, 2006.
223. GUEDES, T. D. J.; ALECRIM, M. F.; OLIVEIRA, F. M.; LIMA, A. B.; BARBOSA, S. L.; DOS SANTOS, W. T. P. Determination of prazosin in pharmaceutical samples by flow injection analysis with multiple-pulse amperometric detection using boron-doped diamond electrode. **Journal of Solid State Electrochemistry**, v. 20, n. 9, p. 2445-2451, 2015.
224. GIMENES, D. T.; SANTOS, W. T. P. D.; MUNOZ, R. A. A.; RICHTER, E. M. Internal standard in flow injection analysis with amperometric detection. **Electrochemistry Communications**, v. 12, n. 2, p. 216-218, 2010.
225. COLTRO, W. K. T.; NEVES, R. D. S.; MOTHEO, A. D. J.; DA SILVA, J. A. F.; CARRILHO, E. Microfluidic devices with integrated dual-capacitively coupled contactless conductivity detection to monitor binding events in real time. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 192, p. 239-246, 2014.
226. TRIROJ, N.; JAROENAPIBAL, P.; BERESFORD, R. Gas-assisted focused ion beam fabrication of gold nanoelectrode arrays in electron-beam evaporated alumina films for microfluidic electrochemical sensors. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 187, p. 455-460, 2013.
227. HUSKA, D.; HUBALEK, J.; ADAM, V.; KIZEK, R. Miniaturized electrochemical detector as a tool for detection of DNA amplified by PCR. **Electrophoresis**, v. 29, n. 24, p. 4964-4971, 2008.

228. REGIART, M.; FERNANDEZ-BALDO, M. A.; VILLARROEL-ROCHA, J.; MESSINA, G. A.; BERTOLINO, F. A.; SAPAG, K.; TIMPERMAN, A. T.; RABA, J. Microfluidic immunosensor based on mesoporous silica platform and CMK-3/poly-acrylamide-co-methacrylate of dihydrolipoic acid modified gold electrode for cancer biomarker detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 963, p. 83-92, 2017.
229. JOO, S.; PARK, S.; CHUNG, T. D.; KIM, H. C. Integration of a Nanoporous Platinum Thin Film into a Microfluidic System for Non-enzymatic Electrochemical Glucose Sensing. **Analytical Science**, v. 23, p. 277-281, 2007.
230. GES, I. A.; CURRIE, K. P.; BAUDENBACHER, F. Electrochemical detection of catecholamine release using planar iridium oxide electrodes in nanoliter microfluidic cell culture volumes. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 34, n. 1, p. 30-36, 2012.
231. HONG, Y.; WU, M.; CHEN, G.; DAI, Z.; ZHANG, Y.; CHEN, G.; DONG, X. 3D Printed Microfluidic Device with Microporous Mn₂O₃-Modified Screen Printed Electrode for Real-Time Determination of Heavy Metal Ions. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 8, n. 48, p. 32940-32947, 2016.
232. WATANABE, T.; SHIBANO, S.; MAEDA, H.; SUGITANI, A.; KATAYAMA, M.; MATSUMOTO, Y.; EINAGA, Y. Fabrication of a Microfluidic Device with Boron-doped Diamond Electrodes for Electrochemical Analysis. **Electrochimica Acta**, v. 197, p. 159-166, 2016.
233. KO, E.; TRAN, V.-K.; GENG, Y.; CHUNG, W. S.; PARK, C. H.; KIM, M. K.; JIN, G. H.; SEONG, G. H. Continuous electrochemical detection of hydrogen peroxide by Au-Ag bimetallic nanoparticles in microfluidic devices. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 792, p. 72-78, 2017.
234. GHASEMI, A.; AMIRI, H.; ZARE, H.; MASROOR, M.; HASANZADEH, A.; BEYZAVI, A.; AREF, A. R.; KARIMI, M.; HAMBLIN, M. R. Carbon nanotubes in microfluidic lab-on-a-chip technology: current trends and future perspectives. **Microfluidics and Nanofluidics**, v. 21, n. 9, p. 151-1-151-19, 2017.
235. KARUWAN, C.; WISITSORAAT, A.; CHAISUWAN, P.; NACAPRICHA, D.; TUANTRANONT, A. Screen-printed graphene-based electrochemical sensors for a microfluidic device. **Analytical Methods**, v. 9, n. 24, p. 3689-3695, 2017.
236. RONKAINEN, N. J.; HALSALL, H. B.; HEINEMAN, W. R. Electrochemical biosensors. **Chemical Society Reviews**, v. 39, n. 5, p. 1747-1763, 2010.
237. EVTUGYN, G. **Biosensors: Essentials**. Heidelberg: Springer, 2014.
238. MROSS, S.; PIERRAT, S.; ZIMMERMANN, T.; KRAFT, M. Microfluidic enzymatic biosensing systems: A review. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 70, p. 376-391, 2015.
239. ZHU, C.; YANG, G.; LI, H.; DU, D.; LIN, Y. Electrochemical sensors and biosensors based on nanomaterials and nanostructures. **Analytical Chemistry**, v. 87, n. 1, p. 230-249, 2015.
240. CASTILLO, J.; GÁSPÁR, S.; LETH, S.; NICULESCU, M.; MORTARI, A.; BONTIDEAN, I.; SOUKHAREV, V.; DORNEANU, S. A.; RYABOV, A. D.; CSÖREGI, E. Biosensors for life quality. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 102, n. 2, p. 179-194, 2004.
241. PUTZBACH, W.; RONKAINEN, N. J. Immobilization techniques in the fabrication of nanomaterial-based electrochemical biosensors: a review. **Sensors**, v. 13, n. 4, p. 4811-4840, 2013.

242. ROCCHITTA, G.; SPANU, A.; BABUDIERI, S.; LATTE, G.; MADEDDU, G.; GALLERI, G.; NUOLI, S.; BAGELLA, P.; DEMARTIS, M. I.; FIORE, V.; MANETTI, R.; SERRA, P. A. Enzyme Biosensors for Biomedical Applications: Strategies for Safeguarding Analytical Performances in Biological Fluids. **Sensors**, v. 16, n. 6, p. 780-1-780-21, 2016.
243. DAS, P.; DAS, M.; CHINNADAYYALA, S. R.; SINGHA, I. M.; GOSWAMI, P. Recent advances on developing 3rd generation enzyme electrode for biosensor applications. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 79, p. 386-397, 2016.
244. BUNYAKUL, N.; BAEUMNER, A. J. Combining electrochemical sensors with miniaturized sample preparation for rapid detection in clinical samples. **Sensors**, v. 15, n. 1, p. 547-564, 2014.
245. FARGHALY, O. A.; HAMEED, R. S. A.; ABU-NAWWAS, A. H. Analytical Application Using Modern Electrochemical Techniques. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 9, p. 3287-3318, 2014.
246. ZHANG, K.; PELLETT, J. D.; NARANG, A. S.; WANG, Y. J.; ZHANG, Y. T. Reactive impurities in large and small molecule pharmaceutical excipients – A review. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, in press, 2017.
247. BARIN, J. S.; MELLO, P. A.; MESKO, M. F.; DUARTE, F. A.; FLORES, E. M. Determination of elemental impurities in pharmaceutical products and related matrices by ICP-based methods: a review. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 408, n. 17, p. 4547-4566, 2016.
248. SIDDIQUI, M. R.; ALOTHMAN, Z. A.; RAHMAN, N. Analytical techniques in pharmaceutical analysis: A review. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 10, p. S1409-S1421, 2017.
249. KAR, A. **Pharmaceutical Drug Analysis**. Nova Deli: New Age International Pvt Ltd Publishers, 2005.
250. JOZWIAK-BEBENISTA, M.; NOWAK, J. Paracetamol: Mechanism of action, applications and safety concern. **Acta Poloniae Pharmaceutica**, v. 71, p. 11-23, 2014.
251. GRAHAM, G. G.; SCOTT, K. F. Mechanism of Action of Paracetamol. **American Journal of Therapeutics**, v. 12, p. 46-55, 2005.
252. WANG, H.; ZHANG, S.; LI, S.; QU, J. Electrochemical sensor based on palladium-reduced graphene oxide modified with gold nanoparticles for simultaneous determination of acetaminophen and 4-aminophenol. **Talanta**, v. 178, p. 188-194, 2018.
253. ESPINOSA BOSCH, M.; RUIZ SANCHEZ, A. J.; SANCHEZ ROJAS, F.; BOSCH OJEDA, C. Determination of paracetamol: historical evolution. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 42, n. 3, p. 291-321, 2006.
254. PENG, H. C.; WANG, Y. H.; WEN, C. C.; WANG, W. H.; CHENG, C. C.; CHEN, Y. H. Nephrotoxicity assessments of acetaminophen during zebrafish embryogenesis. **Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicology & Pharmacology : CBP**, v. 151, n. 4, p. 480-486, 2010.
255. KIM, T.-W.; ISLAM, T.; JUNG, K.-Y. Design and synthesis of non-steroidal diclofenac derivatives as anti-inflammatory drugs. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 16, n. 3, p. 461-466, 2010.

256. ALTMAN, R.; BOSCH, B.; BRUNE, K.; PATRIGNANI, P.; YOUNG, C. Advances in NSAID development: evolution of diclofenac products using pharmaceutical technology. **Drugs**, v. 75, n. 8, p. 859-877, 2015.
257. GOODARZIAN, M.; KHALILZADE, M. A.; KARIMI, F.; KUMAR GUPTA, V.; KEYVANFARD, M.; BAGHERI, H.; FOULADGAR, M. Square wave voltammetric determination of diclofenac in liquid phase using a novel ionic liquid multiwall carbon nanotubes paste electrode. **Journal of Molecular Liquids**, v. 197, p. 114-119, 2014.
258. SHALAUDDIN, M.; AKHTER, S.; BAGHERI, S.; ABD KARIM, M. S.; ADIB KADRI, N.; BASIRUN, W. J. Immobilized copper ions on MWCNTS-Chitosan thin film: Enhanced amperometric sensor for electrochemical determination of diclofenac sodium in aqueous solution. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 42, n. 31, p. 19951-19960, 2017.
259. ZHOU, T.; LI, L.; WANG, J.; CHEN, X.; YANG, G.; SHAN, Y. 4-Phosphatephenyl-modified glassy carbon electrode for real-time and simultaneous electrochemical monitoring of paracetamol and diclofenac release from electrospun nanofibers. **Analytical Methods**, v. 7, n. 21, p. 9289-9294, 2015.
260. FAYAZ, M. K.; ABEL, R. J.; PUGH, S. C.; HALL, J. E.; DJAIANI, G.; MECKLENBURGH, J. S. Opioid-sparing effects of diclofenac and paracetamol lead to improved outcomes after cardiac surgery. **Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia**, v. 18, n. 6, p. 742-747, 2004.
261. MUNISHANKAR, B.; FETTES, P.; MOORE, C.; MCLEOD, G. A. A double-blind randomised controlled trial of paracetamol, diclofenac or the combination for pain relief after caesarean section. **International Journal of Obstetric Anesthesia**, v. 17, n. 1, p. 9-14, 2008.
262. GOMAA, S. Adverse effects induced by diclofenac, ibuprofen, and paracetamol toxicity on immunological and biochemical parameters in Swiss albino mice. **The Journal of Basic and Applied Zoology**, v. 79, n. 1, p. 1-9, 2018.
263. BAMGBOSE, B. O.; AKINWANDE, J. A.; ADEYEMO, W. L.; LADEINDE, A. L.; AROTIBA, G. T.; OGUNLEWE, M. O. Prospective, Randomized, Open-Label, Pilot Clinical Trial Comparing the Effects of Dexamethasone Coadministered with Diclofenac Potassium or Acetaminophen and Diclofenac Potassium Monotherapy After Third-Molar Extraction in Adults. **Current Therapeutic Research**, v. 67, p. 229-240, 2006.
264. NAVA-ÁLVAREZ, R.; RAZO-ESTRADA, A. C.; GARCÍA-MEDINA, S.; GÓMEZ-OLIVAN, L. M.; GALAR-MARTÍNEZ, M. Oxidative Stress Induced by Mixture of Diclofenac and Acetaminophen on Common Carp (*Cyprinus carpio*). **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 225, n. 2, p. 1873-1-1873-9, 2014.
265. GOMEZ-OLIVAN, L. M.; NERI-CRUZ, N.; GALAR-MARTINEZ, M.; ISLAS-FLORES, H.; GARCIA-MEDINA, S. Binary mixtures of diclofenac with paracetamol, ibuprofen, naproxen, and acetylsalicylic acid and these pharmaceuticals in isolated form induce oxidative stress on *Hyalella azteca*. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 186, n. 11, p. 7259-7271, 2014.
266. FENT, K.; WESTON, A. A.; CAMINADA, D. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. **Aquatic Toxicology**, v. 76, n. 2, p. 122-159, 2006.

267. PETRIE, B.; BARDEN, R.; KASPRZYK-HORDERN, B. A review on emerging contaminants in wastewaters and the environment: current knowledge, understudied areas and recommendations for future monitoring. **Water Research**, v. 72, p. 3-27, 2015.
268. LAWRENCE, J. R.; ZHU, B.; SWERHONE, G. D.; ROY, J.; TUMBER, V.; WAISER, M. J.; TOPP, E.; KORBER, D. R. Molecular and microscopic assessment of the effects of caffeine, acetaminophen, diclofenac, and their mixtures on river biofilm communities. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 508-517, 2012.
269. MESSINA, G. A.; DE VITO, I. E.; RABA, J. On-line microfluidic sensor integrated with an enzyme-modified pre-cell for the monitoring of paracetamol in pharmaceutical samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 559, n. 2, p. 152-158, 2006.
270. CHU, Q.; JIANG, L.; TIAN, X.; YE, J. Rapid determination of acetaminophen and p-aminophenol in pharmaceutical formulations using miniaturized capillary electrophoresis with amperometric detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 606, n. 2, p. 246-251, 2008.
271. IDRIS, A. M.; ELGORASHE, R. E. E.; ASSUBAIE, F. N.; ALNAJJAR, A. O. Inexpensive Green Method for Diclofenac Assay Utilizing Sequential Injection Chromatography. **Chromatographia**, v. 73, n. 5-6, p. 431-437, 2011.
272. GUZMÁN-HERNÁNDEZ, D. S.; MARTÍNEZ-CRUZ, M. A.; RAMÍREZ-SILVA, M. T.; ROMERO-ROMO, M.; CORONA-AVENDAÑO, S.; MENDOZA-HUIZAR, L. H.; PALOMAR-PARDAVÉ, M. Simultaneous electrochemical quantification of naproxen, acetaminophen and diclofenac using a bare carbon paste electrode. **Analytical Methods**, v. 8, n. 44, p. 7868-7872, 2016.
273. GUZMÁN-HERNÁNDEZ, D. S.; CID-CERÓN, M. M.; ROMERO-ROMO, M.; RAMÍREZ-SILVA, M. T.; PÁEZ-HERNÁNDEZ, M. E.; CORONA-AVENDAÑO, S.; PALOMAR-PARDAVÉ, M. Taking advantage of CTAB micelles for the simultaneous electrochemical quantification of diclofenac and acetaminophen in aqueous media. **RSC Advances**, v. 7, n. 64, p. 40401-40410, 2017.
274. OKOTH, O. K.; YAN, K.; LIU, L.; ZHANG, J. Simultaneous Electrochemical Determination of Paracetamol and Diclofenac Based on Poly(diallyldimethylammonium chloride) Functionalized Graphene. **Electroanalysis**, v. 28, p. 76-82, 2016.
275. BRUNTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, K. L. **The Pharmacological - Basis of Therapeutics**. Nova Iorque: McGraw-Hill, 2004.
276. KHODAVEISI, J.; SHABANI, A. M. H.; DADFARNIA, S.; SABERI, D. A novel sensor for determination of naproxen based on change in localized surface plasmon peak of functionalized gold nanoparticles. **Spectrochimica Acta. Part A, Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 179, p. 11-16, 2017.
277. WANG, L. F.; CHIANG, H. N.; CHEN, W. B. Synthesis and properties of a naproxen polymeric prodrug. **Pharmacy and Pharmacology**, v. 54, p. 1129-1135, 2002.
278. ADHOUM, N.; MONSER, L.; TOUMI, M.; BOUJLEL, K. Determination of naproxen in pharmaceuticals by differential pulse voltammetry at a platinum electrode. **Analytica Chimica Acta**, v. 495, n. 1-2, p. 69-75, 2003.
279. KANAKARAJU, D.; MOTTI, C. A.; GLASS, B. D.; OELGEMOLLER, M. TiO₂ photocatalysis of naproxen: effect of the water matrix, anions and diclofenac on degradation rates. **Chemosphere**, v. 139, p. 579-588, 2015.

280. SOLTANI, N.; TAVAKKOLI, N.; MOSAVIMANESH, Z. S.; DAVAR, F. Electrochemical determination of naproxen in the presence of acetaminophen using a carbon paste electrode modified with activated carbon nanoparticles. **Comptes Rendus Chimie**, v. 21, n. 1, p. 54-60, 2018.
281. NOROUZI, P.; DOUSTY, F.; GANJALI, M. R.; DANESHGAR, P. Dysprosium Nanowire Modified Carbon Paste Electrode for the Simultaneous Determination of Naproxen and Paracetamol: Application in Pharmaceutical Formulation and Biological Fluid. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 4, p. 1373-1386, 2009.
282. TASHKHOURIAN, J.; HEMMATEENEJAD, B.; BEIGIZADEH, H.; HOSSEINI-SARVARI, M.; RAZMI, Z. ZnO nanoparticles and multiwalled carbon nanotubes modified carbon paste electrode for determination of naproxen using electrochemical techniques. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 714-715, p. 103-108, 2014.
283. LENIK, J.; LYSZCZEK, R. Functionalized beta-cyclodextrin based potentiometric sensor for naproxen determination. **Materials Science & Engineering C, Materials for Biological Applications**, v. 61, p. 149-157, 2016.
284. PHILLIPS, T. M.; WELLNER, E. F. Measurement of naproxen in human plasma by chip-based immunoaffinity capillary electrophoresis. **Biomedical Chromatography : BMC**, v. 20, n. 6-7, p. 662-667, 2006.
285. GRADMAN, A. H.; BASILE, J. N.; CARTER, B. L.; BAKRIS, G. L.; AMERICAN SOCIETY OF HYPERTENSION WRITING, G. Combination therapy in hypertension. **Journal of the American Society of Hypertension : JASH**, v. 4, n. 1, p. 42-50, 2010.
286. KALRA, S.; KALRA, B.; AGRAWAL, N. Combination therapy in hypertension: An update. **Diabetology & Metabolic Syndrome**, v. 2, p. 1-11, 2010.
287. LI, L.; LAI, C.; XUAN, X.; GAO, C.; LI, N. Simultaneous Determination of Hydrochlorothiazide and Losartan Potassium in Osmotic Pump Tablets by Microemulsion Liquid Chromatography. **Journal of Chromatographic Science**, v. 54, n. 8, p. 1415-1420, 2016.
288. ALGHAMDI, A. F. Quantitative Analysis of Hydrochlorothiazide and Its Determination in a Pharmaceutical Preparation by HPLC. **Pharmaceutical Chemistry Journal**, v. 48, n. 12, p. 843-847, 2015.
289. TAGLIETTI, F.; DEL NONNO, F.; BAIOCCHINI, A.; FALASCA, L.; PIERI, S.; CAPONE, A.; GRILLI, E.; CHINELLO, P.; PETROSILLO, N. Acute hepatocellular and cholestatic injury during therapy with hydrochlorothiazide - clinicohistopathologic findings: a case report. **Journal of Medical Case Reports**, v. 4, p. 332-1-332-4, 2010.
290. CADWALLADER, A. B.; DE LA TORRE, X.; TIERI, A.; BOTRE, F. The abuse of diuretics as performance-enhancing drugs and masking agents in sport doping: pharmacology, toxicology and analysis. **British Journal of Pharmacology**, v. 161, n. 1, p. 1-16, 2010.
291. DEVENTER, K.; POZO, O. J.; VAN EENOO, P.; DELBEKE, F. T. Detection of urinary markers for thiazide diuretics after oral administration of hydrochlorothiazide and altizide-relevance to doping control analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 12, p. 2466-2473, 2009.
292. ABSALAN, G.; AKHOND, M.; KARIMI, R.; RAMEZANI, A. M. Simultaneous determination of captopril and hydrochlorothiazide by using a carbon ionic liquid electrode modified with copper hydroxide nanoparticles. **Microchimica Acta**, v. 185, n. 2, p. 1-8, 2018.

293. GONZÁLEZ-VARGAS, C.; SERRANO, N.; ARIÑO, C.; SALAZAR, R.; ESTEBAN, M.; DÍAZ-CRUZ, J. M. Voltammetric Determination of Anti-Hypertensive Drug Hydrochlorothiazide Using Screen-Printed Electrodes Modified with L-Glutamic Acid. **Chemosensors**, v. 5, n. 4, p. 25-1-25-12, 2017.
294. ER, E.; ÇELIKKAN, H.; AKSU, M. L.; ERK, N. A novel and highly sensitive electrochemical sensor based on a high-quality modified graphene electrode for the determination of hydrochlorothiazide in pharmaceutical formulations and human plasma. **Analytical Methods**, v. 7, n. 21, p. 9254-9260, 2015.
295. BEITOLLAHI, H.; HAMZAVI, M.; TORKZADEH-MAHANI, M. Electrochemical determination of hydrochlorothiazide and folic acid in real samples using a modified graphene oxide sheet paste electrode. **Materials Science & Engineering C, Materials for Biological Applications**, v. 52, p. 297-305, 2015.
296. KADAVILPPARAMPU, A. M.; AL LAWATI, H. A. J.; SULIMAN, F. E. O. Chemiluminescence selectivity enhancement in the on-chip Ru(bpy)3(2+) system: The potential role of buffer type and pH in the determination of hydrochlorothiazide in combined formulations and human plasma. **Luminescence : the Journal of Biological and Chemical Luminescence**, v. 32, n. 8, p. 1494-1503, 2017.
297. ALNAJJAR, A. O.; IDRIS, A. M.; ATTIMARAD, M. V.; ALDUGHAISH, A. M.; ELGORASHE, R. E. Capillary electrophoresis assay method for metoprolol and hydrochlorothiazide in their combined dosage form with multivariate optimization. **Journal of Chromatographic Science**, v. 51, n. 1, p. 92-97, 2013.
298. DENOROY, L.; ZIMMER, L.; RENAUD, B.; PARROT, S. Ultra high performance liquid chromatography as a tool for the discovery and the analysis of biomarkers of diseases: a review. **Journal of Chromatography B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 927, p. 37-53, 2013.
299. FINSTERER, J. Biomarkers of peripheral muscle fatigue during exercise. **BMC Musculoskeletal Disorders**, v. 13, p. 218-2-218-13, 2012.
300. POSTE, G. Bring on the biomarkers. **Nature**, v. 469, p. 156-157, 2011.
301. FRANGOIANNIS, N. G. Biomarkers: hopes and challenges in the path from discovery to clinical practice. **Translational Research : the Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 159, n. 4, p. 197-204, 2012.
302. NGAMCHUEA, K.; CHAISIWAMONGKHOL, K.; BATCHELOR-MCAULEY, C.; COMPTON, R. G. Chemical analysis in saliva and the search for salivary biomarkers - a tutorial review. **The Analyst**, v. 143, n. 1, p. 81-99, 2017.
303. POSTE, G. Biospecimens, biomarkers, and burgeoning data: the imperative for more rigorous research standards. **Trends in Molecular Medicine**, v. 18, n. 12, p. 717-722, 2012.
304. MAJKIĆ-SINGH, N. What is a Biomarker? From its Discovery to Clinical Application. **Journal of Medical Biochemistry**, v. 30, n. 3, p. 186-192, 2011.
305. PAGADUAN, J. V.; SAHORE, V.; WOOLLEY, A. T. Applications of microfluidics and microchip electrophoresis for potential clinical biomarker analysis. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 407, n. 23, p. 6911-6922, 2015.

306. MATZEU, G.; FLOREA, L.; DIAMOND, D. Advances in wearable chemical sensor design for monitoring biological fluids. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 211, p. 403-418, 2015.
307. SANJAY, S. T.; FU, G.; DOU, M.; XU, F.; LIU, R.; QI, H.; LI, X. Biomarker detection for disease diagnosis using cost-effective microfluidic platforms. **The Analyst**, v. 140, n. 21, p. 7062-7081, 2015.
308. KHALILPOUR, A.; KILIC, T.; KHALILPOUR, S.; ÁLVAREZ, M. M.; YAZDI, I. K. Proteomic-based biomarker discovery for development of next generation diagnostics. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 101, p. 475-491, 2017.
309. SHENDURSE, A. M.; KHEDKAR, C. D. Glucose: Properties and Analysis. In: CABALLERO, B.; FINGLAS, P. M.; TOLDRĂ, F. **Encyclopedia of Food and Health**. Oxford: Academic Press, 2016. p. 239-247.
310. ROBERTS, J. D.; CASERIO, M. C. **Basic Principles of Organic Chemistry**. Menlo Park: W. A. Benjamin, Inc., 1977.
311. IBRAHIM, M.; ALAAM, M.; EL-HAES, H.; JALBOUT, A. F.; LEON, A. Analysis of the structure and vibrational spectra of glucose and fructose. **Eclética Química**, v. 31, p. 15-21, 2006.
312. ZOIDIS, E.; PAPAMIKOS, V. Glucose: Metabolism and Regulation. In: CABALLERO, B.; FINGLAS, P. M.; TOLDRĂ, F. **Encyclopedia of Food and Health**. Oxford: Academic Press, 2016. p. 233-238.
313. OGURTSOVA, K.; DA ROCHA FERNANDES, J. D.; HUANG, Y.; LINNENKAMP, U.; GUARIGUATA, L.; CHO, N. H.; CAVAN, D.; SHAW, J. E.; MAKAROFF, L. E. IDF Diabetes Atlas: Global estimates for the prevalence of diabetes for 2015 and 2040. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 128, p. 40-50, 2017.
314. CALCUTT, N. A.; COOPER, M. E.; KERN, T. S.; SCHMIDT, A. M. Therapies for hyperglycaemia-induced diabetic complications: from animal models to clinical trials. **Nature Reviews. Drug Discovery**, v. 8, n. 5, p. 417-429, 2009.
315. CHAPMAN, T. M.; PERRY, C. M. Insulin Detemir. **Drugs**, v. 64, p. 2577-2595, 2004.
316. WHALEY-CONNELL, A.; SOWERS, J. R. Implications for glucose measures in the diabetes control and complications trial/epidemiology of diabetes interventions and complications study. **Diabetes**, v. 63, n. 1, p. 45-47, 2014.
317. KIRK, J. K.; STEGNER, J. Self-Monitoring of Blood Glucose: Practical Aspects. **Journal of Diabetes Science and Technology**, v. 4, p. 435-439, 2010.
318. HANSEN, J. S.; CHRISTENSEN, J. B.; PETERSEN, J. F.; HOEG-JENSEN, T.; NORRILD, J. C. Arylboronic acids: A diabetic eye on glucose sensing. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 161, n. 1, p. 45-79, 2012.
319. NICHOLS, S. P.; KOH, A.; STORM, W. L.; SHIN, J. H.; SCHOENFISCH, M. H. Biocompatible materials for continuous glucose monitoring devices. **Chemical Reviews**, v. 113, n. 4, p. 2528-2549, 2013.
320. HEINEMANN, L. Finger Pricking and Pain_A Never Ending Story. **Journal of Diabetes Science and Technology**, v. 2, p. 919-921, 2008.

321. ARAKAWA, T.; KUROKI, Y.; NITTA, H.; CHOUHAN, P.; TOMA, K.; SAWADA, S.; TAKEUCHI, S.; SEKITA, T.; AKIYOSHI, K.; MINAKUCHI, S.; MITSUBAYASHI, K. Mouthguard biosensor with telemetry system for monitoring of saliva glucose: A novel cavitas sensor. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 84, p. 106-111, 2016.
322. MUNJE, R. D.; MUTHUKUMAR, S.; PRASAD, S. Lancet-free and label-free diagnostics of glucose in sweat using Zinc Oxide based flexible bioelectronics. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 238, p. 482-490, 2017.
323. LA BELLE, J. T.; ENGELSCHALL, E.; LAN, K.; SHAH, P.; SAEZ, N.; MAXWELL, S.; ADAMSON, T.; ABOU-EID, M.; MCAFERTY, K.; PATEL, D. R.; COOK, C. B. A Disposable Tear Glucose Biosensor-Part 4: Preliminary Animal Model Study Assessing Efficacy, Safety, and Feasibility. **Journal of Diabetes Science and Technology**, v. 8, n. 1, p. 109-116, 2014.
324. REBRIN, K.; SHEPPARD JR., N. F.; STEIL, G. M. Use of Subcutaneous Interstitial Fluid Glucose to Estimate Blood Glucose: Revisiting Delay and Sensor Offset. **Journal of Diabetes Science and Technology**, v. 4, p. 1087-1098, 2010.
325. MIYASHITA, M.; ITO, N.; IKEDA, S.; MURAYAMA, T.; OGUMA, K.; KIMURA, J. Development of urine glucose meter based on micro-planer amperometric biosensor and its clinical application for self-monitoring of urine glucose. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 24, n. 5, p. 1336-1340, 2009.
326. ASCASO, F. J.; HUERVA, V. Noninvasive Continuous Monitoring of Tear Glucose Using Glucose-Sensing Contact Lenses. **Optometry and Vision Science**, v. 93, p. 426-434, 2016.
327. BACA, J. T.; FINEGOLD, D. N.; ASHER, S. A. Tear Glucose Analysis for the Noninvasive Detection and Monitoring of Diabetes Mellitus. **The Ocular Surface**, v. 5, p. 280-293, 2007.
328. CHEN, L.; TSE, W. H.; CHEN, Y.; McDONALD, M. W.; MELLING, J.; ZHANG, J. Nanostructured biosensor for detecting glucose in tear by applying fluorescence resonance energy transfer quenching mechanism. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 91, p. 393-399, 2017.
329. KANG, B.-H.; PARK, M.; JEONG, K.-H. Colorimetric Schirmer strip for tear glucose detection. **BioChip Journal**, v. 11, n. 4, p. 294-299, 2017.
330. GABRIEL, E.; GARCIA, P.; LOPES, F.; COLTRO, W. Paper-Based Colorimetric Biosensor for Tear Glucose Measurements. **Micromachines**, v. 8, n. 4, p. 104-1-104-9, 2017.
331. LA BELLE, J. T.; ADAMS, A.; LIN, C. E.; ENGELSCHALL, E.; PRATT, B.; COOK, C. B. Self-monitoring of tear glucose: the development of a tear based glucose sensor as an alternative to self-monitoring of blood glucose. **Chemical Communications**, v. 52, n. 59, p. 9197-9204, 2016.
332. YAN, Q.; PENG, B.; SU, G.; COHAN, B. E.; MAJOR, T. C.; MEYERHOFF, M. E. Measurement of tear glucose levels with amperometric glucose biosensor/capillary tube configuration. **Analytical Chemistry**, v. 83, n. 21, p. 8341-8346, 2011.
333. RUAN, J.-L.; CHEN, C.; SHEN, J.-H.; ZHAO, X.-L.; QIAN, S.-H.; ZHU, Z.-G. A Gelated Colloidal Crystal Attached Lens for Noninvasive Continuous Monitoring of Tear Glucose. **Polymers**, v. 9, n. 4, p. 125-1-125-12, 2017.

334. ALEXEEV, V. L.; DAS, S.; FINEGOLD, D. N.; ASHER, S. A. Photonic crystal glucose-sensing material for noninvasive monitoring of glucose in tear fluid. **Clinical Chemistry**, v. 50, n. 12, p. 2353-2360, 2004.
335. YAO, H.; SHUM, A. J.; COWAN, M.; LAHDESMÄKI, I.; PARVIZ, B. A. A contact lens with embedded sensor for monitoring tear glucose level. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 26, n. 7, p. 3290-3296, 2011.
336. MAIUOLO, J.; OPPEDISANO, F.; GRATTERI, S.; MUSCOLI, C.; MOLLACE, V. Regulation of uric acid metabolism and excretion. **International Journal of Cardiology**, v. 213, p. 8-14, 2016.
337. PASALIC, D.; MARINKOVIC, N.; FEHER-TURKOVIC, L. Uric acid as one of the important factors in multifactorial disorders – facts and controversies. **Biochemia Medica**, v. 22, p. 63-75, 2012.
338. BEBERASHVILI, I.; SINUANI, I.; AZAR, A.; SHAPIRO, G.; FELDMAN, L.; STAV, K.; SANDBANK, J.; AVERBUKH, Z. Serum uric acid as a clinically useful nutritional marker and predictor of outcome in maintenance hemodialysis patients. **Nutrition**, v. 31, n. 1, p. 138-147, 2015.
339. HEINIG, M.; JOHNSON, R. J. Role of uric acid in hypertension, renal disease, and metabolic syndrome. **Cleveland Clinic Journal of Medicine**, v. 73, p. 1059-1064, 2006.
340. SOLTANI, Z.; RASHEED, K.; KAPUSTA, D. R.; REISIN, E. Potential role of uric acid in metabolic syndrome, hypertension, kidney injury, and cardiovascular diseases: is it time for reappraisal? **Current Hypertension Reports**, v. 15, n. 3, p. 175-181, 2013.
341. BECKER, M. A.; JOLLY, M. Hyperuricemia and associated diseases. **Rheumatic Diseases Clinics of North America**, v. 32, n. 2, p. 275-293, 2006.
342. NGO, T. C.; ASSIMOS, D. G. Uric Acid Nephrolithiasis: Recent Progress and Future Directions. **Reviews in Urology**, v. 9, p. 17-27, 2007.
343. CHANG, C. P.; NAGEL, D. J.; VELASQUEZ, M. T.; ZAGHLOUL, M. E. Compact optical microfluidic uric acid analysis system. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 26, n. 10, p. 4155-4161, 2011.
344. CHEN, X.; CHEN, J.; WANG, F.; XIANG, X.; LUO, M.; JI, X.; HE, Z. Determination of glucose and uric acid with bienzyme colorimetry on microfluidic paper-based analysis devices. **Biosensors & bioelectronics**, v. 35, n. 1, p. 363-368, 2012.
345. GABRIEL, E. F.; GARCIA, P. T.; CARDOSO, T. M.; LOPES, F. M.; MARTINS, F. T.; COLTRO, W. K. Highly sensitive colorimetric detection of glucose and uric acid in biological fluids using chitosan-modified paper microfluidic devices. **The Analyst**, v. 141, n. 15, p. 4749-4756, 2016.
346. KUMAR, A.; HENS, A.; ARUN, R. K.; CHATTERJEE, M.; MAHATO, K.; LAYEK, K.; CHANDA, N. A paper based microfluidic device for easy detection of uric acid using positively charged gold nanoparticles. **The Analyst**, v. 140, n. 6, p. 1817-1821, 2015.
347. LIANG, R. P.; GAN, G. H.; QIU, J. D. Surface modification of poly(dimethylsiloxane) microfluidic devices and its application in simultaneous analysis of uric acid and ascorbic acid in human urine. **Journal of Separation Science**, v. 31, n. 15, p. 2860-2867, 2008.

348. CHU, Q. C.; LIN, M.; GENG, C. H.; YE, J. N. Determination of Uric Acid in Human Saliva and Urine Using Miniaturized Capillary Electrophoresis with Amperometric Detection. **Chromatographia**, v. 65, n. 3-4, p. 179-184, 2006.
349. YU, J.; WANG, S.; GE, L.; GE, S. A novel chemiluminescence paper microfluidic biosensor based on enzymatic reaction for uric acid determination. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 26, n. 7, p. 3284-3289, 2011.
350. YU, J.; GE, L.; HUANG, J.; WANG, S.; GE, S. Microfluidic paper-based chemiluminescence biosensor for simultaneous determination of glucose and uric acid. **Lab on a Chip**, v. 11, n. 7, p. 1286-1291, 2011.
351. YAO, Y.; ZHANG, C. A novel screen-printed microfluidic paper-based electrochemical device for detection of glucose and uric acid in urine. **Biomedical Microdevices**, v. 18, n. 5, p. 92-1-92-9, 2016.
352. GRABOWSKA, I.; CHUDY, M.; DYBKO, A.; BRZOZKA, Z. Uric acid determination in a miniaturized flow system with dual optical detection. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 130, n. 1, p. 508-513, 2008.
353. CHANG, S. K.; ISMAIL, A.; DAUD, Z. A. M. Ascorbic Acid: Properties, Determination and Uses. In: CABALLERO, B.; FINGLAS, P. M.; TOLDRÁ, F. **Encyclopedia of Food and Health**. Oxford: Academic Press, 2016. p. 275-284.
354. DU, J.; CULLEN, J. J.; BUETTNER, G. R. Ascorbic acid: chemistry, biology and the treatment of cancer. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1826, n. 2, p. 443-457, 2012.
355. DAUD, Z. A. M.; ISMAIL, A.; SARMADI, B. Ascorbic Acid: Physiology and Health Effects. In: CABALLERO, B.; FINGLAS, P. M.; TOLDRÁ, F. **Encyclopedia of Food and Health**. Oxford: Academic Press, 2016. p. 266-274.
356. SHEKHOVTSOVA, T. N.; MUGINOVA, S. V.; LUCHININA, J. A.; GALIMOVA, A. Z. Enzymatic methods in food analysis: determination of ascorbic acid. **Analytica Chimica Acta**, v. 573-574, p. 125-132, 2006.
357. MANCHESTER, K. L. An orange a day keeps the scurvy away. **TIPS**, v. 19, p. 167-170, 1998.
358. CAMARENA, V.; WANG, G. The epigenetic role of vitamin C in health and disease. **Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS**, v. 73, n. 8, p. 1645-1658, 2016.
359. SINGER, R. F. Vitamin C supplementation in kidney failure: effect on uraemic symptoms. **Nephrology, Dialysis, Transplantation : Official Publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association**, v. 26, n. 2, p. 614-620, 2011.
360. RUTKOWSKI, R.; RUTKOWSKI, K.; RUTKOWSKA-TALIPSKA, J.; SOWA, P.; SULKOWSKI, S. Vitamin C: is it time to re-evaluate its role in health and disease? **Advances in Dermatology and Allergology**, v. 6, p. 456-460, 2012.
361. ASHOR, A. W.; LARA, J.; MATHERS, J. C.; SIERVO, M. Effect of vitamin C on endothelial function in health and disease: a systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. **Atherosclerosis**, v. 235, n. 1, p. 9-20, 2014.

362. FIGUEROA-MENDEZ, R.; RIVAS-ARANCIBIA, S. Vitamin C in Health and Disease: Its Role in the Metabolism of Cells and Redox State in the Brain. **Frontiers in Physiology**, v. 6, p. 397, 2015.
363. JACKOWSKA, K.; KRYSINSKI, P. New trends in the electrochemical sensing of dopamine. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 405, n. 11, p. 3753-3771, 2013.
364. PFEIL, U.; KUNCOVA, J.; BRUGGMANN, D.; PADDENBERG, R.; RAFIQ, A.; HENRICH, M.; WEIGAND, M. A.; SCHLUTER, K. D.; MEWE, M.; MIDDENDORFF, R.; SLAVIKOVA, J.; KUMMER, W. Intrinsic vascular dopamine - a key modulator of hypoxia-induced vasodilatation in splanchnic vessels. **The Journal of Physiology**, v. 592, n. 8, p. 1745-1756, 2014.
365. ARREOLA, R.; ALVAREZ-HERRERA, S.; PEREZ-SANCHEZ, G.; BECERRIL-VILLANUEVA, E.; CRUZ-FUENTES, C.; FLORES-GUTIERREZ, E. O.; GARCES-ALVAREZ, M. E.; DE LA CRUZ-AGUILERA, D. L.; MEDINA-RIVERO, E.; HURTADO-ALVARADO, G.; QUINTERO-FABIAN, S.; PAVON, L. Immunomodulatory Effects Mediated by Dopamine. **Journal of Immunology Research**, v. 2016, p. 1-31, 2016.
366. BUTINI, S.; NIKOLIC, K.; KASSEL, S.; BRUCKMANN, H.; FILIPIC, S.; AGBABA, D.; GEMMA, S.; BROGI, S.; BRINDISI, M.; CAMPIANI, G.; STARK, H. Polypharmacology of dopamine receptor ligands. **Progress in Neurobiology**, v. 142, p. 68-103, 2016.
367. WANG, Z.; QIAN, Y.; WEI, X.; ZHANG, Y.; WU, G.; LU, X. An "on-off" Electrochemiluminescence Biosensor Based on Molecularly Imprinted Polymer and Recycling Amplifications for Determination of Dopamine. **Electrochimica Acta**, v. 250, p. 309-319, 2017.
368. WONG, D. L.; TAI, T. C.; WONG-FAULL, D. C.; CLAYCOMB, R.; MELONI, E. G.; MYERS, K. M.; CARLEZON, W. A., JR.; KVETNANSKY, R. Epinephrine: a short- and long-term regulator of stress and development of illness : a potential new role for epinephrine in stress. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 32, n. 5, p. 737-748, 2012.
369. AMORIM, C. G.; ARAUJO, A. N.; MONTENEGRO, M. C. Exploiting sequential injection analysis with lab-on-valve and miniaturized potentiometric detection Epinephrine determination in pharmaceutical products. **Talanta**, v. 72, n. 4, p. 1255-1260, 2007.
370. UMEGAKI, H.; IKARI, H.; NAKAHATA, H.; YOSHIMURA, J.; ENDO, H.; YAMAMOTO, T.; IGUCHI, A. Low plasma epinephrine in elderly female subjects of dementia of Alzheimer type. **Brain Research**, v. 858, p. 67-70, 2000.
371. WIERZBICKA, E.; SZULTKA-MŁYŃSKA, M.; BUSZEWSKI, B.; SULKA, G. D. Epinephrine sensing at nanostructured Au electrode and determination its oxidative metabolism. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 237, p. 206-215, 2016.
372. LI, J.; WANG, X.; DUAN, H.; WANG, Y.; LUO, C. Ultra-sensitive determination of epinephrine based on TiO₂-Au nanoclusters supported on reduced graphene oxide and carbon nanotube hybrid nanocomposites. **Materials Science & Engineering C, Materials for Biological Applications**, v. 64, p. 391-398, 2016.
373. WORLD ANTI-DOPING AGENCY. **Doping Code: Prohibited List**. 2017.
374. DAVLETBAEVA, P.; FALKOVA, M.; SAFONOVA, E.; MOSKVIN, L.; BULATOV, A. Flow method based on cloud point extraction for fluorometric determination of epinephrine in human urine. **Analytica Chimica Acta**, v. 911, p. 69-74, 2016.

375. JAYAMALI, W. D.; HERATH, H.; KULATHUNGA, A. Myocardial infarction during anaphylaxis in a young healthy male with normal coronary arteries- is epinephrine the culprit? **BMC Cardiovascular Disorders**, v. 17, n. 1, p. 237-1-237-5, 2017.
376. KANWAR, M.; IRVIN, C. B.; FRANK, J. J.; WEBER, K.; ROSMAN, H. Confusion about epinephrine dosing leading to iatrogenic overdose: a life-threatening problem with a potential solution. **Annals of Emergency Medicine**, v. 55, n. 4, p. 341-344, 2010.
377. PALMIERE, C.; BEVALOT, F.; MALICIER, D.; GROUZMANN, E.; FRACASSO, T.; FANTON, L. A case of suicide by self-injection of adrenaline. **Forensic Science, Medicine, and Pathology**, v. 11, n. 3, p. 421-426, 2015.
378. HE, D.; LI, S.; ZHANG, P.; LUO, H. CVD graphene incorporating polymerized L-cysteine as an electrochemical sensing platform for simultaneous determination of dopamine and ascorbic acid. **Analytical Methods**, v. 9, n. 47, p. 6689-6697, 2017.
379. NEZHAD, M. R. H.; TASHKHOURIAN, J.; KHODAVEISI, J.; KHOSHI, M. R. Simultaneous colorimetric determination of dopamine and ascorbic acid based on the surface plasmon resonance band of colloidal silver nanoparticles using artificial neural networks. **Analytical Methods**, v. 2, n. 9, p. 1263-1269, 2010.
380. SOLHJOO, A.; KHAJEHSHARIFI, H. Multivariate Calibration Applied to the Simultaneous Spectrophotometric Determination of Ascorbic Acid, Tyrosine and Epinephrine in Pharmaceutical Formulation and Biological Fluids. **Current Analytical Chemistry**, v. 12, p. 580-593, 2016.
381. HALOI, S.; GOSWAMI, P.; DAS, D. K. Differentiating response of 2,7-dichlorofluorescein intercalated CTAB modified Na-MMT clay matrix towards dopamine and ascorbic acid investigated by electronic, fluorescence spectroscopy and electrochemistry. **Applied Clay Science**, v. 77-78, p. 79-82, 2013.
382. HASANPOUR, F.; NEKOEINIA, M.; RASHIDI, H. Application of Pyrogallol Azo Derivative as a Mediator for Simultaneous Voltammetric Sensing of Ascorbic Acid, Epinephrine, Acetaminophen, and Tryptophan. **IEEE Sensors Journal**, v. 16, p. 7992-7998, 2016.
383. ZOU, H. L.; LI, B. L.; LUO, H. Q.; LI, N. B. 0D-2D heterostructures of Au nanoparticles and layered MoS₂ for simultaneous detections of dopamine, ascorbic acid, uric acid, and nitrite. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 253, p. 352-360, 2017.
384. ATTA, N. F.; EL-KADY, M. F. Novel poly(3-methylthiophene)/Pd, Pt nanoparticle sensor: Synthesis, characterization and its application to the simultaneous analysis of dopamine and ascorbic acid in biological fluids. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 145, n. 1, p. 299-310, 2010.
385. WANG, X.; WU, M.; TANG, W.; ZHU, Y.; WANG, L.; WANG, Q.; HE, P.; FANG, Y. Simultaneous electrochemical determination of ascorbic acid, dopamine and uric acid using a palladium nanoparticle/graphene/chitosan modified electrode. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 695, p. 10-16, 2013.
386. MAO, H.; JI, C.; LIU, M.; SUN, Y.; LIU, D.; WU, S.; ZHANG, Y.; SONG, X.-M. Hydrophilic polymer/polypyrrole/graphene oxide nanosheets with different performances in electrocatalytic applications to simultaneously determine dopamine and ascorbic acid. **RSC Advances**, v. 6, n. 113, p. 111632-111639, 2016.
387. TAEI, M.; HASANPOUR, F.; TAVAKKOLI, N.; BAHRAEIAN, M. Electrochemical characterization of poly(fuchsine acid) modified glassy carbon electrode and its

application for simultaneous determination of ascorbic acid, epinephrine and uric acid. **Journal of Molecular Liquids**, v. 211, p. 353-362, 2015.

388. KOÇAK, Ç. C.; DURSUN, Z. Simultaneous determination of ascorbic acid, epinephrine and uric acid at over-oxidized poly(p-aminophenol) film modified electrode. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 694, p. 94-103, 2013.

389. TALEB, M.; IVANOV, R.; BEREZNEV, S.; KAZEMI, S. H.; HUSSAINOVA, I. Ultra-sensitive voltammetric simultaneous determination of dopamine, uric acid and ascorbic acid based on a graphene-coated alumina electrode. **Microchimica Acta**, v. 184, n. 12, p. 4603-4610, 2017.

390. ZHANG, Y.; JI, Y.; WANG, Z.; LIU, S.; ZHANG, T. Electrodeposition synthesis of reduced graphene oxide-carbon nanotube hybrids on indium tin oxide electrode for simultaneous electrochemical detection of ascorbic acid, dopamine and uric acid. **RSC Advances**, v. 5, n. 129, p. 106307-106314, 2015.

391. NOROOZIFAR, M.; KHORASANI-MOTLAGH, M.; AKBARI, R.; PARIZI, M. B. Simultaneous Voltammetric Measurement of Ascorbic Acid, Epinephrine, Uric Acid and Tyrosine at a Glassy Carbon Electrode Modified with Nanozeolite-Multiwall Carbon Nanotube. **Analytical and Bioanalytical Chemistry Research**, v. 1, p. 62-72, 2014.

392. MURPHY, A.; GOREY, B.; DE GUZMAN, K.; KELLY, N.; NESTERENKO, E. P.; MORRIN, A. Microfluidic paper analytical device for the chromatographic separation of ascorbic acid and dopamine. **RSC Advances**, v. 5, n. 113, p. 93162-93169, 2015.

393. CARVALHAL, R. F.; KFOURI, M. S.; PIAZZETTA, M. H. O.; GOBBI, A. L.; KUBOTA, L. T. Electrochemical Detection in a Paper-Based Separation Device. **Analytical Chemistry**, v. 82, p. 1162-1165, 2010.

394. SHIROMA, L. Y.; SANTHIAGO, M.; GOBBI, A. L.; KUBOTA, L. T. Separation and electrochemical detection of paracetamol and 4-aminophenol in a paper-based microfluidic device. **Analytica Chimica Acta**, v. 725, p. 44-50, 2012.

395. BENLTOUFA, S.; FAYALA, F.; BENNASRALLAH, S. Capillary Rise in Macro and Micro Pores of Jersey Knitting Structure. **Journal of Engineered Fibers and Fabrics**, v. 3, p. 47-54, 2008.

396. NILGHAZ, A.; BAGHERBAIGI, S.; LAM, C. L.; MOUSAVI, S. M.; CÔRCOLES, E. P.; WICKAKSONO, D. H. B. Multiple semi-quantitative colorimetric assays in compact embeddable microfluidic cloth-based analytical device (μ CAD) for effective point-of-care diagnostic. **Microfluidics and Nanofluidics**, v. 19, n. 2, p. 317-333, 2015.

397. HE, X. M.; CHEN, X.; ZHU, G. T.; WANG, Q.; YUAN, B. F.; FENG, Y. Q. Hydrophilic Carboxyl Cotton Chelator for Titanium(IV) Immobilization and Its Application as Novel Fibrous Sorbent for Rapid Enrichment of Phosphopeptides. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 7, n. 31, p. 17356-17362, 2015.

398. LI, B.; DONG, Y.; LI, L. Preparation and catalytic performance of Fe(III)-citric acid-modified cotton fiber complex as a novel cellulose fiber-supported heterogeneous photo-Fenton catalyst. **Cellulose**, v. 22, n. 2, p. 1295-1309, 2015.

399. ZHONG, B.; ZHAO, G. L.; HUANG, X. X.; LIU, J.; CHAI, Z. F.; TANG, X. H.; WEN, G. W.; WU, Y. Binding natural graphite with mesophase pitch: A promising route to future carbon blocks. **Materials Science and Engineering: A**, v. 610, p. 250-257, 2014.

400. MITCHELL, R.; CARR, C. M.; PARFITT, M.; VICKERMAN, J. C.; JONES, C. Surface chemical analysis of raw cotton fibres and associated materials. **Cellulose**, v. 12, n. 6, p. 629-639, 2005.
401. XING, S.; JIANG, J.; PAN, T. Interfacial microfluidic transport on micropatterned superhydrophobic textile. **Lab on a Chip**, v. 13, n. 10, p. 1937-1947, 2013.
402. NEMATOLLAHI, D.; SHAYANI-JAM, H.; ALIMORADI, M.; NIROOMAND, S. Electrochemical oxidation of acetaminophen in aqueous solutions: Kinetic evaluation of hydrolysis, hydroxylation and dimerization processes. **Electrochimica Acta**, v. 54, n. 28, p. 7407-7415, 2009.
403. FILIK, H.; CETINTAS, G.; AVAN, A. A.; KOC, S. N.; BOZ, I. Electrochemical Sensing of Acetaminophen on Electrochemically Reduced Graphene Oxide-Nafion Composite Film Modified Electrode. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 8, p. 5724-5737, 2013.
404. KARIKALAN, N.; KARTHIK, R.; CHEN, S. M.; VELMURUGAN, M.; KARUPPIAH, C. Electrochemical properties of the acetaminophen on the screen printed carbon electrode towards the high performance practical sensor applications. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 483, p. 109-117, 2016.
405. HAGHSHENAS, E.; MADRAKIAN, T.; AFKHAMI, A. A novel electrochemical sensor based on magneto Au nanoparticles/carbon paste electrode for voltammetric determination of acetaminophen in real samples. **Materials Science & Engineering C, Materials for Biological Applications**, v. 57, p. 205-214, 2015.
406. KARUPPIAH, C.; CHEEMALAPATI, S.; CHEN, S.-M.; PALANISAMY, S. Carboxyl-functionalized graphene oxide-modified electrode for the electrochemical determination of nonsteroidal anti-inflammatory drug diclofenac. **Ionics**, v. 21, n. 1, p. 231-238, 2014.
407. AFKHAMI, A.; BAHIRAEI, A.; MADRAKIAN, T. Gold nanoparticle/multi-walled carbon nanotube modified glassy carbon electrode as a sensitive voltammetric sensor for the determination of diclofenac sodium. **Materials Science & Engineering C, Materials for Biological Applications**, v. 59, p. 168-176, 2016.
408. GIMENES, D. T.; MARRA, M. C.; DE FREITAS, J. M.; ABARZA MUÑOZ, R. A.; RICHTER, E. M. Simultaneous determination of captopril and hydrochlorothiazide on boron-doped diamond electrode by batch injection analysis with multiple pulse amperometric detection. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 212, p. 411-418, 2015.
409. GIMENES, D. T.; MARRA, M. C.; ABARZA MUÑOZ, R. A.; ANGNES, L.; RICHTER, E. M. Determination of propranolol and hydrochlorothiazide by batch injection analysis with amperometric detection and capillary electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detection. **Analytical Methods**, v. 6, n. 10, p. 3261-3267, 2014.
410. GIMENES, D. T.; CUNHA, R. R.; RIBEIRO, M. M.; PEREIRA, P. F.; MUNOZ, R. A.; RICHTER, E. M. Two new electrochemical methods for fast and simultaneous determination of codeine and diclofenac. **Talanta**, v. 116, p. 1026-1032, 2013.
411. MACHADO FREITAS, J.; DA COSTA OLIVEIRA, T.; SILVA, P. L.; TOFANELLO GIMENES, D.; ABARZA MUNOZ, R. A.; RICHTER, E. M. Development of a Simple and Fast Electrochemical Method for Screening and Stoichiometric Determination of Dimenhydrinate. **Electroanalysis**, v. 26, n. 9, p. 1905-1911, 2014.

412. MILLER, J. N.; MILLER, J. C. **Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry**. 5 ed. Harlow: Pearson Education Limited, 2005.
413. PEREIRA, P. F.; MARRA, M. C.; LIMA, A. B.; DOS SANTOS, W. T. P.; MUNOZ, R. A. A.; RICHTER, E. M. Fast and simultaneous determination of nimesulide and paracetamol by batch injection analysis with amperometric detection on bare boron-doped diamond electrode. **Diamond and Related Materials**, v. 39, p. 41-46, 2013.
414. DA SILVA, R. A. B.; GIMENES, D. T.; TORMIN, T. F.; MUNOZ, R. A. A.; RICHTER, E. M. Batch injection analysis with amperometric detection: application for simultaneous analysis using a single working electrode. **Analytical Methods**, v. 3, n. 12, p. 2804-2808, 2011.
415. GIMENES, D. T.; DE FREITAS, J. M.; MUNOZ, R. A. A.; RICHTER, E. M. Flow-Injection Amperometric Method for Determination of Diclofenac in Pharmaceutical Formulations Using a Boron-Doped Diamond Electrode. **Electroanalysis**, v. 23, n. 11, p. 2521-2525, 2011.
416. BASHAR, M. M.; SIDDIQUEE, M. A.; KHAN, M. A. Preparation of cotton knitted fabric by gamma radiation: a new approach. **Carbohydrate polymers**, v. 120, p. 92-101, 2015.
417. NERURKAR, M.; JOSHI, M.; ADIVAREKAR, R. Bioscouring of cotton using lipase from marine bacteria *Bacillus sonorensis*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 175, n. 1, p. 253-265, 2015.
418. LEE, C. M.; KAFLE, K.; BELIAS, D. W.; PARK, Y. B.; GLICK, R. E.; HAIGLER, C. H.; KIM, S. H. Comprehensive analysis of cellulose content, crystallinity, and lateral packing in *Gossypium hirsutum* and *Gossypium barbadense* cotton fibers using sum frequency generation, infrared and Raman spectroscopy, and X-ray diffraction. **Cellulose**, v. 22, n. 2, p. 971-989, 2015.
419. ADEBAJO, M. O.; FROST, R. L.; KLOPROGGE, J. T.; KOKOT, S. Raman spectroscopic investigation of acetylation of raw cotton. **Spectrochimica Acta Part A, Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 64, n. 2, p. 448-453, 2006.
420. LIU, Y.; KOKOT, S.; SAMBI, T. J. Vibrational spectroscopic investigation of Australian cotton cellulose fibres. Part 1. A Fourier transform Raman study. **The Analyst**, v. 123, p. 633-636, 1998.
421. MONTES, R. H. O.; STEFANO, J. S.; RICHTER, E. M.; MUNOZ, R. A. A. Exploring Multiwalled Carbon Nanotubes for Naproxen Detection. **Electroanalysis**, v. 26, n. 7, p. 1449-1453, 2014.
422. LANKELMA, J.; NIE, Z.; CARRILHO, E.; WHITESIDES, G. M. Paper-based analytical device for electrochemical flow-injection analysis of glucose in urine. **Analytical Chemistry**, v. 84, n. 9, p. 4147-4152, 2012.
423. SAKTHIVEL, M. A portable limiting current solid-state electrochemical diffusion hole type hydrogen sensor device for biomass fuel reactors: Engineering aspect. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, n. 2, p. 905-911, 2008.
424. BAGOTSKY, V. S. **Fundamentals of Electrochemistry**. 2 ed. Hoboken: John Wiley & Sons, 2006.
425. BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. **Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications**. 2 ed. New York: John Wiley & Sons, 2001.

426. CHEN, I.; LINDNER, E. Lab-on-Chip Flow Injection Analysis System without an External Pump and Valves and Integrated with an In Line Electrochemical Detector. **Analytical Chemistry**, v. 81, p. 9955-9960, 2009.
427. ZHOU, C.; MU, Y.; YANG, M.; SONG, Q.; ZHANG, Y.; WU, Z.; XIANG, L.; JIN, W.; JIN, Q. A gravity-induced flow injection system for surface plasmon resonance biosensor. **Talanta**, v. 112, p. 95-100, 2013.
428. HUANG, Y. Z.; DU, W. B.; PAN, J. Z.; FANG, Q. Microfluidic chip-based valveless flow injection analysis system with gravity-driven flows. **The Analyst**, v. 133, n. 9, p. 1237-1241, 2008.
429. GUAN, Y. X.; XU, Z. R.; DAI, J.; FANG, Z. L. The use of a micropump based on capillary and evaporation effects in a microfluidic flow injection chemiluminescence system. **Talanta**, v. 68, n. 4, p. 1384-1389, 2006.
430. WANG, Y.; HE, Q.; DONG, Y.; CHEN, H. In-channel modification of biosensor electrodes integrated on a polycarbonate microfluidic chip for micro flow-injection amperometric determination of glucose. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 145, n. 1, p. 553-560, 2010.
431. WISITSORAT, A.; SRITONGKHAM, P.; KARUWAN, C.; PHOKHARATKUL, D.; MATUROS, T.; TUANTRANONT, A. Fast cholesterol detection using flow injection microfluidic device with functionalized carbon nanotubes based electrochemical sensor. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 26, n. 4, p. 1514-1520, 2010.
432. FONSECA, A.; RAIMUNDO JR., I. M.; ROHWEDDER, J. J.; LIMA, R. S.; ARAUJO, M. C. A microfluidic device with integrated fluorimetric detection for flow injection analysis. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 396, n. 2, p. 715-723, 2010.
433. XU, Z. R.; ZHONG, C. H.; GUAN, Y. X.; CHEN, X. W.; WANG, J. H.; FANG, Z. L. A microfluidic flow injection system for DNA assay with fluids driven by an on-chip integrated pump based on capillary and evaporation effects. **Lab on a Chip**, v. 8, n. 10, p. 1658-1663, 2008.
434. NALEWAJKO-SIELIWONIUK, E.; IWANOWICZ, M.; KALINOWSKI, S.; KOJŁO, A. Application of direct-injection detector integrated with the multi-pumping flow system to chemiluminescence determination of the total polyphenol index. **Analytica Chimica Acta**, v. 911, p. 82-91, 2016.
435. ROCHA, F. R. P.; RÓDENAS-TORRALBA, E.; MORALES-RUBIO, Á.; GUARDIA, M. D. L. A clean method for flow injection spectrophotometric determination of cyclamate in table sweeteners. **Analytica Chimica Acta**, v. 547, n. 2, p. 204-208, 2005.
436. DE ANDRADE, M. F.; DE ASSIS, S. G. F.; PAIM, A. P. S.; DOS REIS, B. F. Multicommuted Flow Analysis Procedure for Total Polyphenols Determination in Wines Employing Chemiluminescence Detection. **Food Analytical Methods**, v. 7, n. 5, p. 967-976, 2013.
437. NALEWAJKO-SIELIWONIUK, E.; MALEJKO, J.; PAWLUKIEWICZ, A.; KOJŁO, A. A Novel Multicommuted Flow Method with Nanocolloidal Manganese(IV)-Based Chemiluminescence Detection for the Determination of the Total Polyphenol Index. **Food Analytical Methods**, v. 9, n. 4, p. 991-1001, 2015.

438. RUZICKA, J.; HANSEN, E. H. Flow Injection Analysis. Principles, Applications and Trends. **Analytica Chimica Acta**, v. 114, p. 19-44, 1980.
439. ESLAMI, M. R.; ALIZADEH, N. Nanostructured conducting molecularly imprinted polypyrrole based quartz crystal microbalance sensor for naproxen determination and its electrochemical impedance study. **RSC Advances**, v. 6, n. 12, p. 9387-9395, 2016.
440. AGUILAR-LIRA, G. Y.; ROMERO, G. A. Á.; ROJAS-HERNÁNDEZ, A.; PÁEZ-HERNÁNDEZ, M. E.; RODRÍGUEZ-ÁVILA, J. A.; ROMERO-ROMO, M. A. Voltammetric Analysis of Naproxen in Graphite Electrodes and Its Determination in Pharmaceutical Samples. **Electroanalysis**, v. 26, n. 7, p. 1573-1581, 2014.
441. SURYANARAYANAN, V.; ZHANG, Y.; YOSHIHARA, S.; SHIRAKASHI, T. Voltammetric Assay of Naproxen in Pharmaceutical Formulations Using Boron-Doped Diamond Electrode. **Electroanalysis**, v. 17, n. 11, p. 925-932, 2005.
442. ZHOU, D.; SUN, J.; CHEN, H.; FANG, H. Electrochemical polymerization of toluidine blue and its application for the amperometric determination of b-D-glucose. **Electrochimica Acta**, v. 43, p. 1803-1809, 1998.
443. YAO, Y.-L.; SHIU, K.-K. Low potential detection of glucose at carbon nanotube modified glassy carbon electrode with electropolymerized poly(toluidine blue O) film. **Electrochimica Acta**, v. 53, n. 2, p. 278-284, 2007.
444. NAVRATIL, R.; KOTZIANOVA, A.; HALOUZKA, V.; OPLETAL, T.; TRSKOVA, I.; TRNKOVA, L.; HRBAC, J. Polymer lead pencil graphite as electrode material: Voltammetric, XPS and Raman study. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 783, p. 152-160, 2016.
445. MAŽEIKIENĖ, R.; NIAURA, G.; EICHER-LORKA, O.; MALINAUSKAS, A. Raman spectroelectrochemical study of Toluidine Blue, adsorbed and electropolymerized at a gold electrode. **Vibrational Spectroscopy**, v. 47, n. 2, p. 105-112, 2008.
446. MAŽEIKIENĖ, R.; NIAURA, G.; MALINAUSKAS, A. In situ Raman spectroelectrochemical study of redox processes at poly(Toluidine blue) modified electrode. **Electrochimica Acta**, v. 53, n. 26, p. 7736-7743, 2008.
447. QI, G.; WANG, Y.; ZHANG, B.; SUN, D.; FU, C.; XU, W.; XU, S. Glucose oxidase probe as a surface-enhanced Raman scattering sensor for glucose. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 408, n. 26, p. 7513-7520, 2016.
448. CERDEIRA FERREIRA, L. M.; DA COSTA, E. T.; DO LAGO, C. L.; ANGNES, L. Miniaturized flow system based on enzyme modified PMMA microreactor for amperometric determination of glucose. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 47, p. 539-544, 2013.
449. WANG, F.; GONG, W.; WANG, L.; CHEN, Z. Enhanced amperometric response of a glucose oxidase and horseradish peroxidase based bienzyme glucose biosensor modified with a film of polymerized toluidine blue containing reduced graphene oxide. **Microchimica Acta**, v. 182, n. 11-12, p. 1949-1956, 2015.
450. LI, J.; KOINKAR, P.; FUCHIWAKI, Y.; YASUZAWA, M. A fine pointed glucose oxidase immobilized electrode for low-invasive amperometric glucose monitoring. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 86, p. 90-94, 2016.
451. ZHANG, Y.; LI, Y.; WU, W.; JIANG, Y.; HU, B. Chitosan coated on the layers' glucose oxidase immobilized on cysteamine/Au electrode for use as glucose biosensor. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 60, p. 271-276, 2014.

452. BANKAR, S. B.; BULE, M. V.; SINGHAL, R. S.; ANANTHANARAYAN, L. Glucose oxidase-an overview. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 4, p. 489-501, 2009.
453. GU, S.; LU, Y.; DING, Y.; LI, L.; SONG, H.; WANG, J.; WU, Q. A droplet-based microfluidic electrochemical sensor using platinum-black microelectrode and its application in high sensitive glucose sensing. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 55, p. 106-112, 2014.
454. QIN, Y.; CUI, J.; ZHANG, Y.; WANG, Y.; ZHANG, X.; ZHENG, H.; SHU, X.; FU, B.; WU, Y. Integration of microfluidic injection analysis with carbon nanomaterials/gold nanowire arrays-based biosensors for glucose detection. **Science Bulletin**, v. 61, n. 6, p. 473-480, 2016.
455. YANG, J.; NAM, Y.-G.; LEE, S.-K.; KIM, C.-S.; KOO, Y.-M.; CHANG, W.-J.; GUNASEKARAN, S. Paper-fluidic electrochemical biosensing platform with enzyme paper and enzymeless electrodes. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 203, p. 44-53, 2014.
456. DENG, H.; TEO, A. K. L.; GAO, Z. An interference-free glucose biosensor based on a novel low potential redox polymer mediator. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 191, p. 522-528, 2014.
457. GANGADHARAN, R.; ANANDAN, V.; ZHANG, A.; DRWIEGA, J. C.; ZHANG, G. Enhancing the performance of a fluidic glucose biosensor with 3D electrodes. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 160, n. 1, p. 991-998, 2011.
458. RAMA, E. C.; COSTA-GARCIA, A.; FERNANDEZ-ABEDUL, M. T. Pin-based electrochemical glucose sensor with multiplexing possibilities. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 88, p. 34-40, 2017.
459. WITKOWSKA NERY, E.; KUNDYS, M.; JELEN, P. S.; JONSSON-NIEDZIOLKA, M. Electrochemical Glucose Sensing: Is There Still Room for Improvement? **Analytical Chemistry**, v. 88, n. 23, p. 11271-11282, 2016.
460. TEHRANI, F.; REINER, L.; BAVARIAN, B. Rapid Prototyping of a High Sensitivity Graphene Based Glucose Sensor Strip. **PloS One**, v. 10, n. 12, p. 0145036-1-0145036-11, 2015.
461. KOKOT, S.; TUAN, N. A.; RINTOUL, L. Discrimination of Reactive Dyes On Cotton Fabric by Raman Spectroscopy and Chemometrics. **Applied Spectroscopy**, v. 51, p. 387-395, 1997.
462. GONG, R.; HU, Y.; CHEN, J.; CHEN, F.; LIU, Z. A cellulose-based carboxyl cotton chelator having citric acid as an anchored ligand: preparation and application as solid phase extractant for copper determination by flame atomic absorption spectrometry. **Microchimica Acta**, v. 158, n. 3-4, p. 315-320, 2007.
463. HE, X. M.; YUAN, B. F.; FENG, Y. Q. Facial synthesis of nickel(II)-immobilized carboxyl cotton chelator for purification of histidine-tagged proteins. **Journal of Chromatography B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 1043, p. 122-127, 2017.
464. DAI, X.; WILDGOOSE, G. G.; SALTER, C.; CROSSLEY, A.; COMPTON, R. G. Electroanalysis Using Macro-, Micro-, and Nanochemical Architectures on Electrode Surfaces. Bulk Surface Modification of Glassy Carbon Microspheres with Gold

Nanoparticles and Their Electrical Wiring Using Carbon Nanotubes. **Analytical Chemistry**, v. 78, p. 6102-6108, 2006.

465. ZHANG, W.; CHEN, J.; LI, Y.; YANG, W.; ZHANG, Y.; ZHANG, Y. Novel UIO-66-NO₂@XC-72 nanohybrid as an electrode material for simultaneous detection of ascorbic acid, dopamine and uric acid. **RSC Advances**, v. 7, n. 10, p. 5628-5635, 2017.

466. KARIKALAN, N.; VELMURUGAN, M.; CHEN, S. M.; CHELLADURAI, K. A copper hexacyanocobaltate nanocubes based dopamine sensor in the presence of ascorbic acid. **RSC Advances**, v. 6, n. 54, p. 48523-48529, 2016.

467. LI, J.; ZHANG, X. Fabrication of Poly(Aspartic Acid)-Nanogold Modified Electrode and Its Application for Simultaneous Determination of Dopamine, Ascorbic Acid, and Uric Acid. **American Journal of Analytical Chemistry**, v. 03, n. 03, p. 195-203, 2012.

468. BICKER, J.; FORTUNA, A.; ALVES, G.; FALCAO, A. Liquid chromatographic methods for the quantification of catecholamines and their metabolites in several biological samples--a review. **Analytica Chimica Acta**, v. 768, p. 12-34, 2013.

469. FEKETE, S.; BECK, A.; VEUTHEY, J. L.; GUILLARME, D. Ion-exchange chromatography for the characterization of biopharmaceuticals. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 113, p. 43-55, 2015.

470. SANGHAVI, B. J.; VARHUE, W.; CHAVEZ, J. L.; CHOU, C. F.; SWAMI, N. S. Electrokinetic preconcentration and detection of neuropeptides at patterned graphene-modified electrodes in a nanochannel. **Analytical Chemistry**, v. 86, n. 9, p. 4120-4125, 2014.

471. KHAN, A. F.; BROWNSON, D. A.; RANDVIIR, E. P.; SMITH, G. C.; BANKS, C. E. 2D Hexagonal Boron Nitride (2D-hBN) Explored for the Electrochemical Sensing of Dopamine. **Analytical Chemistry**, v. 88, n. 19, p. 9729-9737, 2016.

472. KATO, Y.; NAKAMURA, K.; KITAMURA, T.; TSUDA, T.; HASEGAWA, M.; SASAKI, H. Effect of chromatographic conditions on resolution in high-performance ion-exchange chromatography of proteins on nonporous support. **Journal of Chromatography A**, v. 1009, n. 1-2, p. 141-145, 2003.

473. OLIVES, A. I.; GONZÁLEZ-RUIZ, V.; MARTÍN, M. A. Sustainable and Eco-Friendly Alternatives for Liquid Chromatographic Analysis. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 5, n. 7, p. 5618-5634, 2017.

474. FARANDOS, N. M.; YETISEN, A. K.; MONTEIRO, M. J.; LOWE, C. R.; YUN, S. H. Contact lens sensors in ocular diagnostics. **Advanced Healthcare Materials**, v. 4, n. 6, p. 792-810, 2015.

475. BLIUM, Z.; PANKRATOV, D.; SHLEEV, S. Powering electronic contact lenses: current achievements, challenges, and perspectives. **Expert Review of Ophthalmology**, v. 9, p. 269-273, 2014.

476. CUI, R.; WANG, X.; ZHANG, G.; WANG, C. Simultaneous determination of dopamine, ascorbic acid, and uric acid using helical carbon nanotubes modified electrode. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 161, n. 1, p. 1139-1143, 2012.

477. YANG, Y. J.; LI, W. CTAB functionalized graphene oxide/multiwalled carbon nanotube composite modified electrode for the simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine, uric acid and nitrite. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 56, p. 300-306, 2014.

478. KANNAN, A.; SIVANESAN, A.; KALAIVANI, G.; SEVVEL, R. A new class of electropolymerized conducting film from the pyrimidine family for the simultaneous determination of ascorbic acid and dopamine. **RSC Advances**, v. 6, n. 99, p. 97391-97398, 2016.
479. LIAN, Q.; HE, Z.; HE, Q.; LUO, A.; YAN, K.; ZHANG, D.; LU, X.; ZHOU, X. Simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine and uric acid based on tryptophan functionalized graphene. **Analytica Chimica Acta**, v. 823, p. 32-39, 2014.
480. GUO, J. Uric Acid Monitoring with a Smartphone as the Electrochemical Analyzer. **Analytical Chemistry**, v. 88, n. 24, p. 11986-11989, 2016.
481. QIN, C.; TAO, L.; PHANG, Y. H.; ZHANG, C.; CHEN, S. Y.; ZHANG, P.; TAN, Y.; JIANG, Y. Y.; CHEN, Y. Z. The Assessment of the Readiness of Molecular Biomarker-Based Mobile Health Technologies for Healthcare Applications. **Scientific Reports**, v. 5, p. 17854-1-17854-14, 2015.
482. METROHM AUTOLAB B. V. **NOVA: User Manual**. Utrecht, 2016.
483. LIANG, Z.; ZHAI, H.; CHEN, Z.; WANG, H.; WANG, S.; ZHOU, Q.; HUANG, X. A simple, ultrasensitive sensor for gallic acid and uric acid based on gold microclusters/sulfonate functionalized graphene modified glassy carbon electrode. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 224, p. 915-925, 2016.
484. HUANG, L.; JIAO, S.; LI, M. Determination of uric acid in human urine by eliminating ascorbic acid interference on copper(II)-polydopamine immobilized electrode surface. **Electrochimica Acta**, v. 121, p. 233-239, 2014.
485. APARNA, T. K.; SIVASUBRAMANIAN, R.; DAR, M. A. One-pot synthesis of Au-Cu 2 O/rGO nanocomposite based electrochemical sensor for selective and simultaneous detection of dopamine and uric acid. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 741, p. 1130-1141, 2018.
486. LAVANYA, N.; SEKAR, C.; MURUGAN, R.; RAVI, G. An ultrasensitive electrochemical sensor for simultaneous determination of xanthine, hypoxanthine and uric acid based on Co doped CeO₂ nanoparticles. **Materials Science & Engineering C, Materials for Biological Applications**, v. 65, p. 278-286, 2016.
487. DA CRUZ, F. S.; PAULA, F. D. S.; FRANCO, D. L.; DOS SANTOS, W. T. P.; FERREIRA, L. F. Electrochemical detection of uric acid using graphite screen-printed electrodes modified with Prussian blue/poly(4-aminosalicylic acid)/Uricase. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 806, p. 172-179, 2017.
488. ZHANG, L.; FENG, J.; CHOU, K.-C.; SU, L.; HOU, X. Simultaneously electrochemical detection of uric acid and ascorbic acid using glassy carbon electrode modified with chrysanthemum-like titanium nitride. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 803, p. 11-18, 2017.
489. WANG, J.; YANG, B.; ZHONG, J.; YAN, B.; ZHANG, K.; ZHAI, C.; SHIRAISHI, Y.; DU, Y.; YANG, P. Dopamine and uric acid electrochemical sensor based on a glassy carbon electrode modified with cubic Pd and reduced graphene oxide nanocomposite. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 497, p. 172-180, 2017.
490. YUE, H. Y.; SONG, S. S.; HUANG, S.; ZHANG, H.; GAO, X. P. A.; GAO, X.; LIN, X. Y.; YAO, L. H.; GUAN, E. H.; ZHANG, H. J. Preparation of MoS₂-graphene Hybrid Nanosheets and

Simultaneously Electrochemical Determination of Levodopa and Uric Acid. **Electroanalysis**, v. 29, n. 11, p. 2565-2571, 2017.

491. BEITOLLAHI, H.; NEJAD, F. G.; SHAKERI, S. GO/Fe₃O₄@SiO₂ core-shell nanocomposite-modified graphite screen-printed electrode for sensitive and selective electrochemical sensing of dopamine and uric acid. **Analytical Methods**, v. 9, n. 37, p. 5541-5549, 2017.

492. TALEAT, Z.; KHOSHROO, A.; MAZLOUM-ARDAKANI, M. Screen-printed electrodes for biosensing: a review (2008–2013). **Microchimica Acta**, v. 181, n. 9-10, p. 865-891, 2014.

493. EISELE, A. P. P.; MANSANO, G. R.; DE OLIVEIRA, F. M.; CASARIN, J.; TARLEY, C. R. T.; SARTORI, E. R. Simultaneous determination of hydrochlorothiazide and valsartan in combined dosage forms: Electroanalytical performance of cathodically pretreated boron-doped diamond electrode. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 732, p. 46-52, 2014.

494. SANTOS, M. C. G.; TARLEY, C. R. T.; DALL'ANTONIA, L. H.; SARTORI, E. R. Evaluation of boron-doped diamond electrode for simultaneous voltammetric determination of hydrochlorothiazide and losartan in pharmaceutical formulations. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 188, p. 263-270, 2013.

495. PURUSHOTHAMA, H. T.; ARTHOBA NAYAKA, Y. Electrochemical study of hydrochlorothiazide on electrochemically pre-treated pencil graphite electrode as a sensor. **Sensing and Bio-Sensing Research**, v. 16, p. 12-18, 2017.

496. VALEZI, C. F.; PIRES EISELE, A. P.; ROMÃO SARTORI, E. Versatility of a carbon paste electrode coupled to differential pulse voltammetry for determination of lisinopril with its associations (hydrochlorothiazide and amlodipine). **Analytical Methods**, v. 9, n. 31, p. 4599-4608, 2017.

497. MACHINI, W. B.; DAVID-PARRA, D. N.; TEIXEIRA, M. F. Electrochemical investigation of the voltammetric determination of hydrochlorothiazide using a nickel hydroxide modified nickel electrode. **Materials Science & Engineering C, Materials for Biological Applications**, v. 57, p. 344-348, 2015.

498. LOURENCAO, B. C.; SILVA, T. A.; FATIBELLO-FILHO, O.; SWAIN, G. M. Voltammetric Studies of Propranolol and Hydrochlorothiazide Oxidation in Standard and Synthetic Biological Fluids Using a Nitrogen-Containing Tetrahedral Amorphous Carbon (ta-C:N) Electrode. **Electrochimica Acta**, v. 143, p. 398-406, 2014.

499. HUDARI, F. F.; SOUZA, J. C.; ZANONI, M. V. B. Adsorptive stripping voltammetry for simultaneous determination of hydrochlorothiazide and triamterene in hemodialysis samples using a multi-walled carbon nanotube-modified glassy carbon electrode. **Talanta**, v. 179, p. 652-657, 2018.

500. TIAN, F.; LI, H.; LI, M.; LI, C.; LEI, Y.; YANG, B. A tantalum electrode coated with graphene nanowalls for simultaneous voltammetric determination of dopamine, uric acid, L-tyrosine, and hydrochlorothiazide. **Microchimica Acta**, v. 184, n. 6, p. 1611-1619, 2017.

501. JUSTINO, D. D.; LAGE, A. L. A.; SOUTO, D. E. P.; DA SILVA, J. V.; TORRES PIO DOS SANTOS, W.; DE CÁSSIA SILVA LUZ, R.; DAMOS, F. S. Study of the effects of surface pK_a and electron transfer kinetics of electroactive 4-nitrothiophenol/4-mercaptobenzoic acid binary SAM on the simultaneous determination of epinephrine and uric acid. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 703, p. 158-165, 2013.

502. PRADHAN, P.; MASCARENHAS, R. J.; THOMAS, T.; NAMBOOTHIRI, I. N. N.; D'SOUZA, O. J.; MEKHALIF, Z. Electropolymerization of bromothymol blue on carbon paste electrode bulk modified with oxidized multiwall carbon nanotubes and its application in amperometric sensing of epinephrine in pharmaceutical and biological samples. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 732, p. 30-37, 2014.
503. GORCZYŃSKI, A.; KUBICKI, M.; SZYMKOWIAK, K.; ŁUCZAK, T.; PATRONIAK, V. Utilization of a new gold/Schiff-base iron(iii) complex composite as a highly sensitive voltammetric sensor for determination of epinephrine in the presence of ascorbic acid. **RSC Advances**, v. 6, n. 104, p. 101888-101899, 2016.
504. TAEI, M.; HADADZADEH, H.; HASANPOUR, F.; TAVAKKOLI, N.; DOLATABADI, M. H. Simultaneous electrochemical determination of ascorbic acid, epinephrine, and uric acid using a polymer film-modified electrode based on Au nanoparticles/poly(3,3',5,5'-tetrabromo-m-cresolsulfonphthalein). **Ionics**, v. 21, n. 12, p. 3267-3278, 2015.
505. GHANBARI, K.; HAJIAN, A. Electrochemical characterization of Au/ZnO/PPy/RGO nanocomposite and its application for simultaneous determination of ascorbic acid, epinephrine, and uric acid. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 801, p. 466-479, 2017.
506. CHEN, M. F.; MA, X. Y. Simultaneous detection of epinephrine, uric acid, and ascorbic acid with graphene-modified electrode. **Russian Journal of Applied Chemistry**, v. 87, n. 2, p. 200-206, 2014.
507. ENSAFI, A. A.; REZAEI, B.; ZARE, S. Z. M.; TAEI, M. Simultaneous determination of ascorbic acid, epinephrine, and uric acid by differential pulse voltammetry using poly(3,3'-bis[N,N-bis(carboxymethyl)aminomethyl]-o-cresolsulfonphthalein) modified glassy carbon electrode. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 150, n. 1, p. 321-329, 2010.
508. REN, W.; LUO, H. Q.; LI, N. B. Simultaneous voltammetric measurement of ascorbic acid, epinephrine and uric acid at a glassy carbon electrode modified with caffeic acid. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 21, n. 7, p. 1086-1092, 2006.
509. TAEI, M.; JAMSHIDI, M. Highly selective determination of ascorbic acid, epinephrine, and uric acid by differential pulse voltammetry using poly(Adizol Black B)-modified glassy carbon electrode. **Journal of Solid State Electrochemistry**, v. 18, n. 3, p. 673-683, 2013.
510. MUTHUKUMARAN, P.; SUMATHI, C.; WILSON, J.; RAVI, G. Enzymeless biosensor based on β -NiS@rGO/Au nanocomposites for simultaneous detection of ascorbic acid, epinephrine and uric acid. **RSC Advances**, v. 6, n. 99, p. 96467-96478, 2016.

ANEXO I

PRODUÇÃO CIENTÍFICA

AGUSTINI, D.; FEDALTO, L.; BERGAMINI, M. F.; MARCOLINO JR., L. H. Microfluidic thread based electroanalytical system for green chromatographic separations. **Lab on a Chip**, v. 18, p. 670-678, 2018.

CARNEIRO, E.; AGUSTINI, D.; FIGUEIREDO-FILHO, L. C. S.; BANKS, C. E.; MARCOLINO-JR., L. H.; BERGAMINI, M. F. 3D-printed Microfluidic Device Based on Cotton Threads for Amperometric Estimation of Antioxidants in Wine Samples. **Electroanalysis**, v. 30, p. 101-108, 2018.

CAETANO, F. R.; CARNEIRO, E.; AGUSTINI, D.; FIGUEIREDO-FILHO, L. C. S.; BANKS, C. E.; BERGAMINI, M. F.; MARCOLINO-JR., L. H. Combination of electrochemical biosensor and textile threads: A microfluidic device for phenol determination in tap water. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 99, p. 382-388, 2018.

AGUSTINI, D.; BERGAMINI, M. F.; MARCOLINO-JR., L. H. Tear glucose detection combining microfluidic thread based device, amperometric biosensor and microflow injection analysis. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 98, p. 161-167, 2017.

AGUSTINI, D.; BERGAMINI, M. F.; MARCOLINO-JR., L. H. Characterization and optimization of low cost microfluidic thread based electroanalytical device for micro flow injection analysis. **Analytica Chimica Acta**, v. 951, p. 108-115, 2017.

OCHIAI, L. M.; AGUSTINI, D.; FIGUEIREDO-FILHO, L. C. S.; BANKS, C. E.; MARCOLINO-JR., L. H.; BERGAMINI, M. F. Electroanalytical thread-device for estriol determination using screen-printed carbon electrodes modified with carbon nanotubes. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 241, p. 978-984, 2017.

AGUSTINI, D.; MARCOLINO-JR., L. H.; BERGAMINI, M. F.; GATTI, A. Dispositivo microfluídico baseado em fios têxteis para aplicações eletroanalíticas. 2016, Brasil. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR10201602735, título: "Dispositivo microfluídico baseado em fios têxteis para aplicações eletroanalíticas" , Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Depósito: 22/11/2016

AGUSTINI, D.; BERGAMINI, M. F.; MARCOLINO-JR., L. H. Low cost microfluidic device based on cotton threads for electroanalytical application. **Lab on a Chip**, v. 16, n. 2, p. 345-352, 2016.

ANEXO II

Disciplinas cursadas	Carga horária (horas)	Créditos	Conceito
Métodos Analíticos de Separação	60	4	A
Métodos Espectroquímicos de Análise	60	4	A
Tópicos Especiais em Química II – Eletroquímica e Interfaces	60	4	A
Tópicos Especiais em Química II – Colóides e Química de Superfícies	60	4	A
Seminários C	15	1	A
Seminários D	15	1	A